



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria

**Serotipificación de cepas de *Escherichia coli* aisladas
de neonatos de alpacas (*Vicugna pacos*) con diarrea en
Cerro de Pasco**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

María del Pilar LLAMOSAS ALVÁN

ASESOR

Siever Miguel MORALES CAUTI

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Llamosas M. Serotipificación de cepas de *Escherichia coli* aisladas de neonatos de alpacas (*Vicugna pacos*) con diarrea en Cerro de Pasco [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria; 2016.



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día jueves 21 de abril de 2016, a las 10:00 horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 055-EAPMV/FMV-2016, integrado por los siguientes profesores:

ALBERTO MANCHEGO SAYÁN	Presidente del Jurado
SIEVER MORALES CAUTI	Asesor de la Tesis
MERCY RAMÍREZ VELÁSQUEZ	Miembro del Jurado
CHRIS PINTO JIMÉNEZ	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **LLAMOSAS ALVÁN, MARÍA DEL PILAR**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

"SEROTIPIFICACIÓN DE CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE CRÍAS DE ALPACAS (*Vicugna pacos*) CON DIARREA EN CERRO DE PASCO"

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECIOCHO (18)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **11:30 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

Alberto Manchego Sayán: Mg. Prof. Principal, D.E.

Siever Morales Cauti: MV. Prof. Asociado, T.P.

Mercy Ramírez Velásquez: Mg. Prof. Auxiliar, D.E.

Chris Pinto Jiménez: Dra. Profesora Invitada





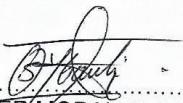
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 055-EAPMV/FMV-2016.

PRESIDENTE :


ALBERTO MANCHEGO SAYÁN

MIEMBROS :


SIEVER MORALES CAUTI
Asesor de la Tesis


MERCY RAMÍREZ VELÁSQUEZ


CHRIS PINTO JIMÉNEZ

San Borja, 21 de abril de 2016

Vº Bº

.....
MV. Mg. HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO
Directora de la Escuela Académico Profesional de
Medicina Veterinaria



DEDICATORIA

*Este trabajo de investigación está dedicado
a mis abuelos Roberto Alván y Carmela Medrano
que a pesar de haber partido hace mucho tiempo
siempre los recordaré con alegría y amor;
a mis padres Mario Llamosas y Carmela Alván,
a mis hermanas Ana María y María Gracia,
y a mi tía Patricia Alván, gracias por estar presentes
en los principales momentos de mi vida y brindarme su apoyo
y cariño incondicional*

AGRADECIMIENTOS

A los docentes de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM por brindarme una formación profesional en todos los años de duración de esta hermosa carrera universitaria.

A los señores del Concytec y a los Doctores de la Universidad Autónoma de México por apoyarme en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A mi padre, Mario Llamosas, que con todo su trabajo, sacrificio y esfuerzo me apoyó, no solo en mi profesión, sino en cualquier meta que me he trazado en mi vida.

Al doctor Siever Morales por aceptarme como tesista y apoyarme en el transcurso del desarrollo del presente trabajo, es un gran asesor.

A Francisco Sicha Romero, por sobre todas las cosas eres mi mejor amigo fuiste una pieza clave para realizar esta tesis, tu compañía fue, es y será muy grata e importante para mí, gracias por escucharme y brindarme tus consejos en todo momento.

A Marcos Saavedra, porque eres mas que un amigo, eres el hermano que nunca tuve, por tomarte el tiempo de revisar este trabajo y darme tus puntos de vista y observaciones.

A Carmen Arias por tu compañerismo y amistad, por las largas pláticas que tenemos cuando nos encontramos y por guiarme en cuanto a documentos se refiera.

A Rosalyn Hurtado y Julio Lavalle, por estar pendientes de mi sustentación a pesar de no poder estar presentes en dicha fecha, gracias por su amistad.

A Julio César Mauricio por todos estos años de amistad a pesar de no vernos seguido y por estar presente uno de los días más importantes para mí.

A Norelli Solano y Eduardo Salazar, por todas las experiencias y anécdotas que vivimos durante el internado de donde floreció una bonita amistad.

A Jorge De la Garza por ser un excelente guía durante nuestra estancia en México y por toda la ayuda recibida de su parte para la realización de la presente tesis.

ÍNDICE

Resumen	ii
Abstract	iii
Indice de cuadros	iv
Abreviaturas	v
I. Introducción	1
II. Marco teórico	
2.1 Características generales	2
2.1.1 Taxonomía	3
2.1.2 Morfología y estructura celular	4
2.1.3 Estructura antigénica	5
2.2 Factores de virulencia	10
2.3 Mecanismo de patogenicidad	14
2.4 Clasificación	17
2.4.1 Serotipificación	18
2.5 Diagnóstico	22
2.6 Importancia en salud pública (serotipos)	25
2.7 Colibacilosis en alpacas	
2.7.1 Epidemiología	28
2.7.2 Signos clínicos	28
2.7.3 Lesiones	29
2.7.4 Diagnóstico diferencial	30
2.7.5 Prevención y control	31
III. Materiales y métodos	
3.1 Lugar de ejecución y periodo de duración	33
3.2 Diseño experimental	33
3.2.1 Tamaño de muestra	
3.2.2 Procedimiento de muestreo	
3.2.3 Cultivo y aislamiento bacteriano	
3.2.4 Preparación y obtención de antígenos somáticos	
3.2.5 Preparación y obtención de antígenos flagelares	
3.2.6 Procedimiento de Serotipificación	
IV. Resultados	37
V. Discusión	40
VI. Conclusiones	45
VII. Bibliografía citada	46

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo identificar los serotipos de *Escherichia coli* presentes en muestras diarreicas de crías de alpacas provenientes de Cerro de Pasco. Para lo cual se tomaron hisopados rectales a 150 animales que se encontraban padeciendo de dicho cuadro clínico. Se aisló, en el 78% (117/150) de animales muestreados, *Escherichia coli* identificándose a través de pruebas bioquímicas convencionales; se utilizó el método de serotipificación por aglutinación en placas. Del total de muestras evaluadas se hallaron 33.3% (39/117) serogrupos y 60.68% (71/117) serotipos. Los serogrupos con mayor frecuencia fueron O8 (9.4%), ONT (8.55%), O118 (7.69%) y O24 (7.69%), en lo que respecta a serotipos los más frecuentes fueron O118:H21 (7.69%), O24:H18 (6.84%) y O74:H39 (6.84%). El 42.25% (30/71) de los serotipos encontrados poseen reportes en la literatura y/o tienen relación con cepas patógenas para las especies animales incluyendo el humano. En conclusión, el cuadro diarreogénico en crías de alpacas se encuentra relacionado con una gama de serotipos con potencial patógeno tanto para los animales como para el ser humano.

Palabras claves: Serotipificación, antígenos, *Escherichia coli*

ABSTRACT

The following study aims to identify the *Escherichia coli* serotypes present in diarrhea samples of newborn alpacas from Cerro de Pasco. In order to accomplish our goal, rectal swabs were taken from 150 animals who showed clinical signs of the disease. *Escherichia coli* was isolated from 78% (117/150) of the animal samples, and it was identified through conventional biochemical testing. The method used was plate agglutination serotyping. Somatic and flagellar antigens were identified for 39/117 (33.3%) serogroups and 71/117 (69.68%) serotypes in the samples tested. The samples with higher frequency were O8 (9.4%), ONT (8.55%), O118 (7.69%) and O24 (7.69%). Most frequent serotypes were O118:H21 (7.69%), O24:H18 (6.84%) and O74:H39 (6.84%). There was a 42.25% (30/71) of serotypes found which had been previously reported in literature or have any relation with pathogenic strains for other animal species including humans. In conclusion, the diarrheal disease of newborn alpaca is associated with pathogenic potential for animals as for humans.

Keywords: Serotyping, antigens, *Escherichia coli*

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de la <i>Escherichia coli</i>	34
Cuadro 2. Frecuencia de serogrupos aislados a partir de muestras de crías de alpaca con diarrea	38
Cuadro 3. Frecuencia de serotipos aislados e identificados a partir de muestras de crías de alpaca con diarrea	39

ABREVIATURAS

EHEC:	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EPEC:	<i>E. coli</i> enteropatógena
ETEC:	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
EIEC:	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EAEC:	<i>E. coli</i> enteroagregativa
DAEC:	<i>E. coli</i> de adherencia difusa
STEC:	<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga
Antígeno O:	Antígeno somático
Antígeno H:	Antígeno flagelar
ONT:	Antígeno somático no pificable
SUH:	Síndrome Urémico Hemolítico
Stx:	Toxina Shiga
ELISA:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
PCR:	Reacción en cadena de la Polimerasa
PCR – RFLP:	PCR - Restriction Fragment Length Polyorphism

I. INTRODUCCIÓN

Los cuadros diarreicos son de las enfermedades más comunes en la producción alpaquera, entre los agentes que causan dicha patología se encuentra la *Escherichia coli*, cuyos patotipos más relacionadas a la enfermedad son la enteropatógena y enterohemorrágica (Silvera *et al.*, 2012). Esta bacteria pertenece al grupo de bacilos gramnegativos anaerobios facultativos (Bhatia e Ichhpujani, 2008), se puede dividir según distintos criterios de clasificación, entre ellos se encuentra la serotipificación que difieren en patogenicidad y virulencia, estos serotipos se definen por los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K) (Ahmad *et al.*, 2011).

En la serotipificación se requiere realizar la identificación de antígenos, para lo cual se promueve la expresión de estas características bajo una metodología definida por Kauffman (Caffer-Terragno, 2001; Manning, 2010), también se puede llevar a cabo a través de técnicas moleculares como PCR, PCR – RFLP (Tiba *et al.*, 2011) y Colony Blot (Nataro y Kpaer, 1998) o técnicas serológicas como ELISA y aglutinación (Manning, 2010).

Respecto a alpacas, el cuadro clínico afecta generalmente a crías entre 1 a 2 meses de edad ocasionando morbilidades y mortalidades de hasta 15% y 20% respectivamente (SENASA, 2011), entre los patotipos involucrados generalmente se tienen a la EPEC y a la EHEC (Luna *et al.*, 2012) sin embargo existe una carencia de información sobre la serotipificación de dicho microorganismo en esta especie animal, es por ellos que la presente investigación tiene como objetivo identificar los serotipos implicados en los cuadros diarreicos de las crías de alpacas en Cerro de Pasco.

I.MARCO TEÓRICO

2.1 Características generales

La *Escherichia coli* es uno de los microorganismos más importantes y estudiados en el laboratorio, pertenece al grupo de bacilos coliformes anaerobios facultativos (Pavia de Sousa, 2006; Alteri y Mobley, 2012), es indicador de contaminación y de calidad sanitaria por su presencia regular en el intestino y heces, es por esta razón que es sumamente importante en salud pública, pues la presencia de esta en cualquier alimento o agua significa el contacto con materia fecal de animales o del ser humano (Madigan *et al.*, 2010; Tenaillon *et al.*, 2010; Odonkor y Ampofo, 2013). Esta bacteria se describió por vez primera en el año 1885 por el pediatra alemán Theodor von Escherich quien la denominó *Bacterium coli commune*, luego en 1919 Castellani y Chalmers le asignaron el nombre de *Escherichia coli* en honor a su descubridor (Manning, 2010).

El crecimiento se da en rangos de temperatura amplios desde 15 a 48°C (Pavia de Sousa, 2006), pero la tasa de crecimiento se da principalmente entre los 37 y 42°C (Nataro y Kaper, 1998; Pavia de Sousa, 2006), sin embargo algunas cepas pueden sobrevivir en temperaturas extremas como 7.5 – 7.8°C y 49°C (Sheutz y Strockbine, 2005), a su vez se desarrolla en un pH de 5.0 – 8.0, siendo lo óptimo el pH neutro (Pavia de Sousa, 2006). Esta especie bacteriana reduce nitratos a nitritos, es positivo a la prueba del rojo metilo que nos indica la producción de ácidos por la fermentación de la glucosa, a la hidrólisis de la úrea que da como resultado CO₂ y NH₃, la mayoría de

cepas fermentan la lactosa y son positivas también a la prueba de indol (Pavia de Sousa, 2006; Bhatia e Ichhpujani, 2008; Calle *et al.*, 2010; Puerta – García y Mateos – Rodríguez, 2010).

Las cepas de *E. coli* se pueden clasificar en base a diferentes criterios, según su diseminación y la localización del cuadro infectante se habla de las cepas intestinales y extraintestinales (Nataro y Kaper, 1998, Kaper *et al.*, 2004), el primer grupo se clasifica de acuerdo al potencial patógeno relacionado a los signos clínicos observados en el individuo en 6 patotipos: enteropatogénico (EPEC), enterotoxigénico (ETEC), enterohemorrágico (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC), esta división es la más utilizada (Nataro y Kaper, 1998; Rodríguez – Ángeles, 2002; Kaper *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2004; Jhonson y Nolan *et al.*, 2009; Lara – Ochoa *et al.*, 2010; Alteri y Mobley, 2012, Jandhyala *et al.*, 2013).

Las *E. coli* extraintestinales (ExPEC) causan signos clínicos y lesiones como meningitis (MAEC) e infección del tracto urinario producido por la *E. coli* uropatógena (UPEC), (Hanley *et al.*, 1985; Nataro y Kaper, 1998; Rodríguez – Ángeles, 2002; Kaper *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Alteri y Mobley, 2012, Jandhyala *et al.*, 2013), dentro de esta clasificación encontramos a los serogrupos y a los serotipos, el primero se basa en la identificación del antígeno somático y en los serotipos se toma en cuenta, además del antígeno somático, al flagelar y al capsular (Nataro y Kaper, 1998; Rodríguez – Ángeles, 2002; Ahmad *et al.*, 2011); según el desarrollo evolutivo y su relación entre marcadores genéticos se divide en grupos filogenéticos: A, B1, B2, D (Wirth *et al.*, 2006), C, E y F (Tenaillon *et al.*, 2010; Donenberg, 2013). Las reacciones bioquímicas entre los patotipos comensales y patógenos muchas veces difieren, un ejemplo de ello es la fermentación rápida del sorbitol por los comensales pero no por la *E. coli* O157:H7, esta última en el agar McConkey – sorbitol forma colonias blancas a incoloras (Puertas – García y Mateos - Rodríguez, 2010; Ahmad *et al.*, 2011); los serotipos de *E. coli* enteroinvasiva son lactosa negativas (Puertas – García y Mateos - Rodríguez, 2010); así mismo las cepas diarreogénicas usan la D – serina como fuente de carbono y nitrógeno, pero no los comensales y cepas uropatógenicas (Pavia de Sousa, 2006).

2.1.1 Taxonomía

Esta bacteria pertenece al dominio *Bacteria*, phylum *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Enterobacteriales*, familia *Enterobacteriaceae*, género

Escherichia, especie *coli* (Garrity *et al.*, 2004, Madigan *et al.*, 2010), es nombrada de esta manera pues los miembros de dicha familia pueden sobrevivir al tracto gastrointestinal, otros géneros reconocidos que se encuentran dentro de esta familia son: *Klebsiella*, *Salmonella* y *Shigella* (Manning, 2010; Ahmad *et al.*, 2011). A pesar que *Escherichia* y *Shigella* son distintos géneros, el análisis de la secuencia de genes del ADN de ambas revela muchas similitudes que sugieren que deberían agruparse en una misma especie, sin embargo se siguen considerando en diferentes grupos puesto que se tiene en cuenta su potencial patógeno para causar enfermedades (Lan y Reeves, 2002; Paiva de Sousa, 2006).

En la página web de la *International Committee on Systematics of Prokaryotes* se hace referencia con mayor especificidad la división taxonómica de *Escherichia coli* es por ello que se agrega el siguiente link: <http://icsp.org/subcommittee/enterobacteriaceae/taxa.html>

2.1.2 Morfología y estructura celular

La *E. coli* es un bacilo gramnegativo anaerobio facultativo el cual puede o no tener movilidad (Nataro y Kaper, 1998; Sheutz y Strockbine, 2005; Bhatia e Ichhpujani, 2008). Su tamaño varía entre 1 – 3 micras de longitud y 0.5 micras de diámetro; además, pueden poseer una capa cubierta laxa o una capa bien definida (Pavia de Sousa, 2006; Puerta – García y Mateos – Rodríguez, 2010). La pared celular se encuentra dividida en una capa de peptidoglucano o mureína, la cual está constituida por ácido N – acetil murámico unido a un péptido por un enlace amida, este péptido se encuentra compuesto por L – alanina, D – alanina, ácido D – glutámico y ácido meso – diaminopimélico (Sheutz y Strockbine, 2005; Pavia de Sousa, 2006), y por otro lado, una membrana exterior que se basa en fosfolípidos, proteínas, lipoproteínas y lipopolisacáridos (LPS) (Maning, 2010).

Las cepas que presentan movilidad lo realizan a través de flagelos, estos son varios apéndices que se proyectan desde la membrana y que también participan en la supervivencia bacteriana (Manning, 2010; Ahmad *et al.*, 2011). La flagelina es la proteína codificada por el gen *fliC*, esta proteína es la que compone a los flagelos, se ha determinado que cada célula bacteriana de *E. coli* posee entre 5 – 10 flagelos por célula (Sheutz y Strockbine, 2005).

Las fimbrias son apéndices que sobresalen de la superficie bacteriana y que tiene la función de unirse o fijarse a otras bacterias para la transmisión de plásmidos, y así intercambiar material genético para conferir las características a otras células bacterianas o se unen a las células del hospedador, el pili tipo 1 es el más común (Van den Broeck *et al.*, 2000; Pavia de Sousa, 2006; Bhatia e Ichhpujani, 2008; Puerta – García y Mateos – Rodríguez, 2010; Brooks *et al.*, 2013). Existen dos grupos: pilis y fibrillas, los primeros son estructuras rígidas de aproximadamente 7 – 8 nm de diámetro mientras que las fibrillas son flexibles y delgadas de un diámetro de aproximadamente 2 – 4 nm (Van den Broeck *et al.*, 2000). Una de las clasificaciones de las fimbrias se basa en la capacidad de adherirse a los glóbulos rojos en presencia de manósidos, se identifican bacterias resistentes a manosa (RM) y otras sensibles a manosa (SM) estas últimas son las que causan la hematoaglutinación (Salit y Gotschlich, 1977; Hanley *et al.*, 1985; Mol y Oudega, 1996; Van den Broeck *et al.*, 2000; Ahmad *et al.*, 2011).

2.1.3 Estructura antigénica

La clasificación serológica se basa en tres componentes: el antígeno somático (O), el antígeno flagelar (H) y el antígeno capsular (K) (Taillon *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2011; Murray *et al.*, 2014), hasta el 2002 se tenían 176, 112 y 60 tipos de antígenos respectivamente (Rodríguez – Ángeles, 2002), con el tiempo se han identificado más antígenos en diferentes investigaciones. Según dicha distribución antigénica Kauffman en 1944 logró tipificar las cepas de *E. coli* brindando el esquema de serotipificación que en estos tiempos se sigue usando, este esquema ha sufrido diversas modificaciones por estudios posteriores (Nataro y Kaper, 1998; Rodríguez – Ángeles, 2002; DebRoy *et al.*, 2011), ejemplo de ello fueron los estudios de Orskov *et al.* (1977, 1984 y 1991) donde modificaron paulatinamente el esquema de serotipificación del antígeno O basándose en el esquema de 20 serogrupos dado por Kauffman *et al.* (1943), así se agregaron algunos serogrupos que no eran identificados hasta llegar a los 176 actuales. La fórmula para nombrar los serotipos es: O: K: H, sin embargo varios de los laboratorios carecen de los sueros necesarios para identificar al antígeno K, por ello la serotipificación del antígeno somático y flagelar es la más utilizada (O: H) (DebRoy *et al.*, 2011). Existen otros antígenos que no son considerados en la tipificación bacteriana pero sí de gran importancia para la supervivencia de la bacteria, se trata del antígeno fimbrial o F (Parija, 2012) y antígeno M o ácido colánico (Orskov, 1977; Kauffman, 1935, 1936) que cumplen la función de adherirse a las células del hospedador (Bakker *et al.*, 1996) y

secretar una sustancia mucosa para la formación de biofilms (Danese *et al.*, 2000) respectivamente.

Antígeno somático (O).

Es un oligosacárido de repetición que se encuentra unido al lipopolisacárido (LPS) de la pared celular (Orskov *et al.*, 1977; Samuel y Reeves, 2003; Puerta – García y Mateos – Rodríguez, 2010; Ahmad *et al.*, 2011); es termoestable, es decir, sus propiedades no se alteran al permanecer a temperaturas altas, característica que se tuvo en cuenta al momento de la identificación serológica (Orskov *et al.*, 1977), en esta misma hay ocasiones en que las cepas no se pueden reconocer por aglutinación con el antisuero pues algunas mutan y pierden la especificidad de este antígeno, a estas se les conoce como rugosas (Reeves, 1994; DebRoy *et al.*, 2011). En la síntesis de este participan 3 grupos de genes que se encuentran dentro del locus *rfb* (Schmith, 1973; Tenaillon *et al.*, 2010) estos son: los genes de procesamiento para la unidad O, genes de síntesis del azúcar de nucleótidos y genes de azúcar transferasa, estos genes codifican para proteínas que se van a encargar de la síntesis y la translocación del antígeno (Samuel y Reeves, 2003).

Los genes de procesamiento codifican las siguientes proteínas: la Wzx (antígeno O flipasa), la Wzy (antígeno O de la polimerasa) y la Wzz; la primera, después de la síntesis del antígeno O, tiene la función de transportarlo hacia el espacio periplasmático atravesando la membrana celular interna (Mulford y Osborn, 1983; McGrath y Osborn, 1991; Daniels *et al.*, 1998), puede ser reemplazada por otra proteína denominada Wzm (DebRoy *et al.*, 2011), la Wzy polimeriza el antígeno (Raetz y Whitfield, 2002) y la Wzz se encarga de la regulación de las unidades del antígeno en algunos serogrupos (O8, O9, O9a, O52 y O99) (DebRoy *et al.*, 2011). Los genes de síntesis del azúcar de nucleótidos codifican para proteínas que se encargan de sintetizar azúcares específicos para ciertos grupos de antígenos O; los genes azúcar transferasa codifican para sintetizar a la enzima glucosyl transferasa la cual participa en la formación de los oligosacáridos del antígeno O (Reeves, 1994).

La presencia del antígeno O, ejerce una resistencia bacteriana hacia la acción bactericida del suero sanguíneo, por ende puede diseminarse y causar infecciones mediante la corriente hematógica (Puerta – García y Mateos – Rodríguez, 2010). La

inmunoglobulina M es la que predomina ante la presencia de este antígeno, generalmente se identifica a través de una reacción de aglutinación (Bhatia e Ichhpujani, 2008; Brooks *et al.*, 2013; Murray *et al.*, 2014). Debido a que varios antígenos O se pueden detectar en una misma célula bacteriana, existen reacciones cruzadas entre *E. coli*, *Shigella* spp, *Salmonella* spp, *Klebsiella* spp y *Providencia* spp (Orskov *et al.*, 1977; Bhatia e Ichhpujani, 2008; Brooks *et al.*, 2013), por ejemplo muchos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* comparten el antígeno O14 (Brooks *et al.*, 2013); además, según el desarrollo filogenético de las bacterias, puede haber reacción cruzada también del antígeno O y las células de mamíferos incluyendo el hombre, incluso tiene relación con el antígeno capsular de la misma bacteria (Orskov *et al.*, 1977), ejemplo de ello es la reacción cruzada entre el antígeno O120 y K31 (Orskov y Orskov, 1976).

Antígeno flagelar (H).

Es un polímero compuesto por varias unidades de flagelina (Fields *et al.*, 1997; Ratiner *et al.*, 2002; Parija, 2012) las cuales son codificadas por los genes *fliC* (Fields *et al.*, 1997; Ratiner 1998; Zhang *et al.*, 2000; Ratiner *et al.*, 2002; Sonntag *et al.*, 2004; Badri *et al.*, 2010; Tiba *et al.*, 2011), *flkA*, *flaA* y *flmA*; el gen *fliC* fue antes llamado *hag*, Ratiner (1998) menciona que en estudios anteriores en *E. coli* K12 encontró que el *hag* poseía dos subtipos, *hagA* y *hagB*, el primero se relacionaba al alelo del gen *fliC* y el otro se encontraba en otra posición por lo que lo nombró *flkA*; de acuerdo a la nueva nomenclatura, los genes *flaA* y *flmA* fueron identificados en cepas de *E. coli* mediante un estudio que realizó Ratiner (1998) para encontrar nuevos genes que codificaran al antígeno flagelar donde halló que el gen *flaA* codifica para el antígeno H44 y H55, y la *flmA* para el H54.

Las unidades de flagelina poseen epítopes en la superficie externa que serán identificados mediante aglutinación (Ratiner *et al.*, 2002), donde generalmente la inmunoglobulina G es la que participa y es identificada en esta prueba (Bhatia e Ichhpujani, 2008; Brooks *et al.*, 2013). Existen dos fases del antígeno que pueden ser identificadas serológicamente mediante aglutinación, la primera es designada por letras minúsculas (a, c, g, y m) y la segunda en números arábigos (1, 5 y 8), los microorganismos pueden presentar una o ambas fases, las cuales son serológicamente distintas (Bhatia e Ichhpujani, 2008; Brooks *et al.*, 2013), en caso de *E. coli* el antígeno es monofásico y generalmente no presenta reacción cruzada con antígenos flagelares de otras bacterias (Bhatia e Ichhpujani, 2008).

En lo que respecta a la nomenclatura, la numeración fue dada en orden a la detección de cada antígeno (ejemplo H1, H2, H3, H4, etc.) y se descubrió que algunos de estos poseían subtipos que se distinguían uno de otro por sus diferentes características serológicas, ejemplos de ello son el H2a, b y H2a, c; H7a, b y H7a, c los cuales pertenecen a los serotipos O55:H2 y O157:H7 respectivamente (Ratiner *et al.*, 2002).

Antígeno capsular (K).

Es un glucopolisacárido (Brooks *et al.*, 2013), el cual pertenece a los antígenos capsulares polisacáridos acidificados (CPS) (Ahmad *et al.*, 2011). Estudios iniciales sobre los antígenos de *E. coli* dividieron al antígeno K en 3 variantes: L, A y B (Orskov *et al.*, 1977), estas se diferencian por sus propiedades físicas, por lo que las cepas cuyo antígeno K era tipificado tenían en su fórmula la variante entre paréntesis (ejemplo: O8:K8(A):H4), en total eran 77 antígenos identificados: 30 de tipo “L”, 26 de tipo “A” y 21 del tipo “B” (Kauffman *et al.*, 1956). Actualmente se han definido dos grupos de antígenos K, el grupo I y el II; los antígenos del primer grupo se encuentra únicamente en las cepas que poseen los serogrupos O8, O9, O20 y O101 (Dodgson *et al.*, 1996) y son expresados a temperaturas entre 18 a 37°C, una de las porciones de algunos de los antígenos del grupo I se encuentra adherida a la cubierta del lípido A, a estos se les denomina K_{LPS} el cual tiene un comportamiento parecido al antígeno O. Los antígenos del grupo II se encuentran, generalmente, en las cepas de *E. coli* extraintestinales, y se expresan a temperatura de 37°C, están unidos a fosfolípidos (Sheutz y Strockbine, 2005).

Los antígenos K2, K3, K10, K11, K19, K54/K96 pertenecen tanto al grupo I como al II puesto que las cápsulas no son reguladas a una temperatura en especial, y según las características genéticas los antígenos K3, K10 y K54/K96 se hallan en un grupo III; se nombrarán a continuación los 60 antígenos capsulares que han sido reconocidos: K1, K2a/ac, K3, K4, K5, K6, K7 (~K56), K8, K9 (=O104), K10, K11, K12 (~K82), K13 (~ K20 and ~K23), K14, K15, K16, K18a, K18ab (~K22), K19, K24, K26, K27, K28, K29, K30, K31, K34, K37, K39, K40, K41, K42, K43, K44, K45, K46, K47, K49 (=O46), K50, K51, K52, K53, K54 (~K96), K55, K74, K84, K85ab/ac (=O141), K87 (= O32), K92, K93, K95, K97, K98, K100, K101, K102, K103, KX104, KX105 y KX106 (Sheutz y Strockbine, 2005). La designación “~” denota a los que son

similares entre sí, los “=” es que son parecidos a esos serogupos y la “X” se les designa a los antígenos temporales (Sheutz y Strockbine, 2005).

Este grupo confiere resistencia bacteriana hacia el suero sanguíneo y la fagocitosis (Bhatia e Ichhpujani, 2008), un ejemplo de ello es que los pacientes con meningitis neonatal por *E. coli* tengan una mayor probabilidad de haber sido infectados por cepas que contengan el antígeno capsular K1 el cual posee dicha característica (Puertas–García y Mateos–Rodríguez, 2010; Brooks *et al.*, 2013).

Antígeno M

Orskov *et al.* (1977) refieren que kaufman (1935, 1936) identificó otro antígeno capsular, al cual lo denominó M pues se relaciona con la mucosidad que producen muchas de las cepas de *E. coli*. Este antígeno también llamado ácido colánico (Danese *et al.*, 2000), está compuesto por unidades repetidas de hexosacárido, las que pueden ser sustituidas por piruvato, formaldehído o acetaldehído (Garegg *et al.*, 1971), que cubre las agrupaciones bacterianas, es decir, participa en la formación de biofilms (Danese *et al.*, 2000). Se necesita de un grupo denominado *wca* que consta de 19 genes que codifican para proteínas y enzimas encargados de la síntesis del ácido colánico (Stevenson *et al.*, 1996) al realizarse la biosíntesis el polisacárido de repetición se une al Und – PP (Undecaprenol Pirofosfato) de la membrana lipídica a través de la acción de glicosiltransferasa, y es transferido al sitio periplasmático para luego ser polimerizado por las proteínas Mzy (Raetz y Whitfield, 2002), también utilizadas para la polimerización del antígeno O. Por otro lado, existe un gen denominado *lon* que aumenta considerablemente la producción del ácido colánico. Trisler y Gotesman (1984) describieron 5 genes que participan en la regulación de este gen y así en la síntesis del antígeno M; los genes que encontraron fueron los siguientes: *cps A*, *cps B*, *cps C*, *cps D* y *cps E*.

Según Kaufman (1966) y Henriksen (1949) este antígeno es el mismo para todas las cepas bacterianas. Si bien es diferente a los antígenos K, puede tener reacción cruzada con algunos, ejemplo de ello son los antígenos de *E. coli* K30 y K39 (Orskov *et al.*, 1977) pues comparte ciertas características con el grupo A del antígeno capsular: composición de azúcares, localización de los cromosomas y alto peso molecular (Trisler y Gotesman, 1984).

Antígeno F

El antígeno fimbrial es una proteína termolábil que se encuentra en las fimbrias o pilis (Parija, 2012), algunos de los antígenos fimbriales identificados son fimbria tipo I, CFA/I, CFA/II, K88, K99, 987P (Mol y Oudega, 1996; Van den Broeck *et al.*, 2000) y F41 (Harel *et al.*, 1991; Van den Broeck *et al.*, 2000), según la nueva nomenclatura propuesta por Orskov y Orskov en 1983 se les denominó F1, F2, F3, F4, F5, F6 y F41 respectivamente (Van den Broeck *et al.*, 2000).

Las subunidades que componen a este antígeno se presentan dependiendo de la clase de antígeno fimbrial; el F4 es el antígeno más investigado en *E. coli* el cual posee una subunidad mayor “FaeG” y 4 subunidades menores “FaeF, FaeH, FaeC y FaeI” (Bakker *et al.*, 1992; Mol y Oudega, 1996; Van den Broeck *et al.*, 2000), codificados por los genes *faeF*, *faeH*, *faeC* y *faeI*, además participan los genes *faeD*, *faeE* y *faeJ*, los dos primeros codifican las chaperonas y una proteína de la membrana externa, respectivamente, necesarias para la transducción, el *faeJ* no se expresa por la disposición que se encuentra en el operón (Bakker *et al.*, 1996). La subunidad FaeG es la que está relacionada con la función de adhesina pues en el estudio de Bakker *et al.* (1996), en el cual utilizaron eritrocitos de pollos, el FaeG fue el que se mantuvo unido a ellos. El F1, se encuentra en la mayoría de las cepas de *E. coli*, posee proteínas de ensamblaje FimC y FimD, una subunidad mayor FimA y subunidades menores FimF, FimD y FimH, se localizan dentro o a lo largo de la subunidad mayor; la FimF y FimD son necesarias para el ensamblaje del antígeno en la membrana externa, la FimH tiene la capacidad de adherirse a la mucosa y se encuentra al inicio del antígeno (Mol y Oudega, 1996).

Se han realizado diversos estudios para relacionar a los serogrupos con cada antígeno fimbrial, Harel *et al.* (1991) realizaron una investigación en cerdos donde identificaron a los 4 antígenos fimbriales (F4, F5, F6, F41) reconocidos en distintos serogrupos de *E. coli*; a pesar de la alta frecuencia encontrada de F4 relacionado al serogrupo O149 en otros estudios de USA, Suecia y República Checa, pocas cepas O149 se relacionaban con ese antígeno fimbrial; en lo que respecta a los antígenos F5, F6 y F41 se encontraron mayormente en cepas de cerdos destetados y se confirmó que la presencia de los serogrupos (08, 09, O20, 064), los que guardan relación con estos antígenos, disminuían conforme avanzaba la edad de los animales.

2.2 Factores de virulencia

La definición de factor de virulencia es muy compleja, sin embargo ha contribuido al mejor entendimiento de la patogénesis bacteriana en los individuos, se trata de cualquier partícula o molécula que actúa sobre el hospedador para permitir la supervivencia bacteriana (Casadevall y Piroffski, 2009); ejemplo de ello es la pared bacteriana pues contiene lipopolisacáridos cuyos fragmentos son utilizados como endotoxinas ejerciendo daño sobre el individuo (Manning, 2010). La adquisición de estos factores se da desde hace millones de años mediante la transmisión genética horizontal, a través diferentes mecanismos moleculares, determinando para muchos de estos el carácter patógeno de la cepa (Lawrence y Ochman, 1998; Döpfer *et al.*, 2010).

De las cuales las adhesinas, son estructuras especializadas que se encargan de unir fuertemente a la célula huésped, dentro de este grupo se encuentran: fimbria de adherencia agregativa tipo 1 o fimbria tipo 1 (AAF 1) que están en la mayoría de cepas de *E. coli* (Salit y Gotschlich, 1977; Parija, 2012), fimbria 1845 presente en las cepas del patotipo DAEC (Rodríguez - Ángeles, 2002) bundle – forming pilus (BFP), pili P, pili Dr, factor colonizador de antígenos (CFA/I, CFA/II), intimina y plásmido para invasión de antígeno (proteína Ipa) (Parija, 2012).

Las fimbrias, aparte de unir la bacteria a las mucosas, provocan reacción de células inflamatorias y causan aglutinación de glóbulos rojos (Salit y Gotschlich, 1977), la fuerte adherencia bacteria – enterocito se da por la presencia de glucoproteínas en las superficies mucosas, ejemplos son la glicoproteína de Tamm–Horsfall, fibronectina y laminina (Sheutz y Strockbine, 2005). El BFP está presente en las cepas enteropatógenas (Rodríguez – Ángeles, 2002; Vidal *et al.*, 2007; Tennant *et al.*, 2009; Ahmad *et al.*, 2011; Luna *et al.*, 2012), estas cepas poseen el plásmido del factor de adherencia de EPEC que les permite expresar el mecanismo de patogenicidad de adherencia localizada, para esto se necesitan 14 genes ubicados en dicho plásmido que actúan en la formación del BFP (Vidal *et al.*, 2007; Bomez *et al.*, 2011; Parija, 2012), si las cepas poseen ese plásmido se denominan EPEC típicas y si no las poseen se denominan EPEC atípicas (Tennant *et al.*, 2009; Gómez *et al.*, 2011). Los pili P, se unen a epítopes de los antígenos P de glóbulos rojos teniendo relación con la hemaglutinación (Parija, 2012), generalmente los poseen cepas que producen pielonefritis y que se unen a células epiteliales y eritrocitos pues estos pilis tienen afinidad por el tracto urinario (Hanley *et al.*, 1985). Por su parte, la intimina, es una proteína codificada por el gen *eae* que se encuentra en las *E. coli*, brinda la capacidad de

adhesión y enfacelamiento se han identificado en humanos 5 tipos de intiminas la α , β , γ , λ y ϵ , todas específicas para los serotipos que participen en este mecanismo (Agin y Wolf, 1997; Sonntag *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2010; Silvera *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2014),

Las toxinas de *E. coli* se clasifican en endotoxinas, exotoxinas (se dividen en enterotoxinas termolábiles y termoestables, y hemolisinas) y verotoxinas (Rigobelo *et al.*, 2006; Bhatia e Ichhpujani, 2008). Las primeras se encuentran relacionadas al LPS, este posee 3 componentes: un polisacárido de repetición no fosforilado, el lípido A y el antígeno O (Orskov *et al.*, 1977; Puerta – García y Mateos – Rodríguez, 2010; DebRoy *et al.*, 2011; Murray *et al.*, 2014); el lípido A actúa como endotoxina pues es el componente bioactivo del LPS (Orskov *et al.*, 1977; DebRoy *et al.*, 2011), posee 2 grupos fosfatos y 6 cadenas de acilo compuestos por 12 o 14 carbonos que activan poderosamente el sistema inmune (Golenbock *et al.*, 1991), la presencia de este en la sangre del individuo puede causar consumo de los factores de coagulación, pirogenicidad, activación del complemento y muerte por shock (Bhatia e Ichhpujani, 2008; Murray *et al.*, 2014). La manera en que causa dichos efectos es que interactúa con los receptores de macrófagos, neutrófilos y otras células (DebRoy *et al.*, 2011) provocando la liberación de citoquinas como las interleucinas (IL) 1, 6, 8, y TNF – α ; además la cascada de coagulación y el complemento se encuentran activadas (Brooks *et al.*, 2013).

La LT, pesa aproximadamente 86000 Daltons (Bhatia e Ichhpujani, 2008), se subdividen en 2 tipos: LTI y LTII, la LT1 tiene importancia en salud pública pues afecta a humanos en comparación con la LTII; se encuentran compuestas por la subunidad A con peso de 25000 Daltons y 5 subunidades B con peso de 1500 Daltons cada una (Bhatia e Ichhpujani, 2008; Parija, 2012). Por su parte, las toxinas termoestables (ST) son polipéptidos que poseen entre 18 a 50 aminoácidos; se dividen en 2 tipos STa (STa1 y STa2) y STb, ambas poseen diferente actividad biológica y reaccionan a distintas pruebas químicas (Bhatia e Ichhpujani, 2008), la STa es una pequeña molécula de metanol monomérico soluble que tiene actividad en humanos causando severos cuadros de diarrea acuosa. La STb es una molécula no soluble que puede causar acumulación de fluidos en el intestino en cerdos lactantes (Parija, 2012). Existe una ST especial conocida como toxina termoestable I (EAST 1) secretada por el patotipo enteroagregativo de *E. coli* y codificada por el gen *astA*, esta toxina posee una actividad

similar a la STa del patotipo enterotoxigénico y comparte igual receptor que este último (Savarino *et al.*, 1993).

La alfa hemolisina es una exotoxina codificada por los genes Hlyc y Hlya ambos necesarios para la secreción de la hemolisina activa (Benz *et al.*, 1989), tiene la capacidad de producir hemólisis uniéndose a la membrana de eritrocitos, células epiteliales y fagocitos (Calieri *et al.*, 1984; Bakás *et al.*, 2013), según el estudio de Benz *et al.* (1989) se comprobó que esta toxina produce la formación de poros transmembrana que aumentarían el daño celular (Ahmad *et al.*, 2011), este daño de la membrana también se produce por el aumento de calcio (Ca⁺) intracelular lo que origina la acción de las fosfolipasas, movilización de radicales libres, entre otros; ese aumento fue demostrado por García (2000), donde monocitos y neutrófilos fueron expuestos a la alfa hemolisina y evaluados a través de fluorescencia, pues ante la elevación de Ca⁺ aumenta esta. Las *E. coli* perteneciente al patotipo enterohemorrágico poseen una hemolisina, similar a la α -hemolisina, llamada EHEC – hemolisina (Ehx), ambas se utilizan como marcadores fenotípicos para poder detectar a las cepas productoras de toxina Shiga (Sheutz y Strockbine, 2005).

La familia de las verotoxinas poseen ese nombre porque se les descubrió por primera vez en las células Vero (cuyo origen es del riñón del mono verde africano *Chlorocebus*), también se les nombra como toxinas Shiga pues se asemejan a la toxina producida por *Shigella dysenteriae* (Rivero *et al.*, 2004; Rigobelo *et al.*, 2006; Parija, 2012), se han descrito dos tipos de verotoxinas: Stx1/VT1 y Stx2/VT2 (Jarvis y Kaper, 1996; Rivero *et al.*, 2004; Rigobelo *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2010; Döpfer *et al.*, 2010; Muniesa *et al.*, 2012; Parija, 2012; Murray *et al.*, 2014) ambas poseen actividad citotóxica y constan de una subunidad A y 5 subunidades B (Lingwood *et al.*, 1987; Muniesa *et al.*, 2012; Parija, 2012; Murray *et al.*, 2014), las subunidades B se unen específicamente al glucolípido globotriaosyl ceramida causando actividad citotóxica (Lingwood *et al.*, 1987; Parija, 2012). Este grupo de toxinas poseen distintas variantes: Stx2c/VT2c, Stx2d/VT2d, es Stx2-O157-TK-51, Stx2e/VT2e, entre otras, la Stx2e/VT2e es la causante de la enfermedad de los edemas en cerdos lactantes (Sheutz y Strockbine, 2005).

El sistema de secreción tipo III (SSTT) es utilizado para la liberación de proteínas efectores que actuarán sobre la célula huésped para promover lesiones como la

adherencia y enfacelamiento de algunas cepas de *E. coli* (Jarvis y Kaper, 1996; Figueroa y Verdugo, 2005), estas cepas comparten la isla de patogenicidad LEE (locus de enfacelamiento de enterocitos), el cual es una fracción de ADN que se encarga de codificar factores de virulencia (Rivero *et al.*, 2004; Figueroa y Verdugo, 2005); la LEE se encuentra dividida en 5 grupos de operones (LEE₁ – LEE₅), los 3 primeros (LEE₁ – LEE₃) codifican a las proteínas que constituyen este sistema de secreción las cuales forman una especie de complejo de aguja (Vidal *et al.*, 2007), LEE₄ codifica genes de las proteínas que se secretan a través del sistema, a estas proteínas se les conoce como Esp (proteínas secretadas por EPEC) (Jarvis y Kaper, 1996; Vidal *et al.*, 2007); la LEE₅, por su parte, codifica a la intimina y a su receptor Tir, este es translocado a través del sistema de secreción al interior de la célula hospedera (Mundy *et al.*, 2005; Vidal *et al.*, 2007). Este sistema se ensambla por lo menos con 19 proteínas, la última con la que se acopla es con la EscF la cual es la punta del complejo de aguja (Vidal *et al.*, 2007).

Los sideróforos; factores de virulencia que captan el hierro del medio para promover el crecimiento y patogénesis bacteriana (Konhauser *et al.*, 2011; Brooks *et al.*, 2013); se clasifican en 3 quelantes enterobactina, yersinabactina y aerobactina (Pavia de Sousa, 2006; Konhauser *et al.*, 2011). Estos sistemas de adquisición de hierro son proteínas que actúan como receptores para captar la ferritina, lactoferrina, hemoglobina (Cowart y Foster, 1985), grupo Hem y compuestos hemoglobina – haptoglobulina (Litwin y Calderwood, 1985); generalmente son codificados por plásmidos o se encuentran en islas de patogenicidad (Pavia de Sousa, 2006; Konhauser *et al.*, 2011), la familia de genes implicada en su síntesis y la regulación de la captación del hierro es la *fur* la cual posee 19pb que actúan como promotores de esta regulación (Litwin y Calderwood, 1985).

2.3 Mecanismo de Patogenicidad

La *E. coli* pertenece a la flora intestinal normal de todos los mamíferos y aves (Kaper *et al.*, 2004; Paiva de Sousa, 2006; Puerta – García y Mateo – Rodríguez, 2010; Jandhyala *et al.*, 2013), sin embargo al haber ciertos eventos como inmunosupresión, lesiones en el tracto gastrointestinal, consumo de alimentos o bebidas contaminadas (Rodríguez – Ángeles, 2002; Manning, 2010; Ahmad *et al.*, 2011; Alteri y Mobley, 2012), zona perianal y ubres contaminadas con heces algunas de las cepas pueden expresar su condición de patógenas oportunistas para el individuo (Ameghino y DeMartini, 1991).

Al ingresar o replicarse las células bacterianas en el organismo descontroladamente, se adhieren a la mucosa intestinal mediante diferentes adhesinas, como el pili o fimbria cuyo receptor se une al de la membrana celular del enterocito, la especificidad de esta unión está dada por el tipo de receptor que posee el animal (Ramirez y Ellis, 1988; Vidal *et al.*, 2007). Luego de la unión, participa el complejo de aguja del sistema de secreción tipo 3 que se proyecta hacia la mucosa intestinal después de haber atravesado la membrana interna, el espacio periplasmático y la membrana externa de la célula bacteriana, a través del complejo se transmiten las proteínas de translocación Esp, la primera es la EspA que se ensambla con la última proteína del complejo de aguja EscF, formando un puente entre la célula bacteriana y la mucosa intestinal. A través del puente se transmiten las proteínas EspB y EspD que se sitúan al final del tubo formando la abertura de este, a este conducto se le conoce como SSTT – translocón, el cual sirve como mediador molecular entre la bacteria y la célula intestinal para la transmisión de proteínas efectoras “EspF, EspG, EspH, EspZ, Tir, entre otras” (Vidal *et al.*, 2007).

Existe una característica especial de algunas cepas: la adhesión - enfacelamiento (A/E), este es un mecanismo de patogenicidad donde se produce una adhesión sumamente fuerte mediada por la presencia de la proteína intimina (Jarvis y Kaper, 1996; Agin y Wolf, 1997; Rivero *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2014), al unirse fijamente a la superficie intestinal provocan el desprendimiento de las microvellosidades (Smith *et al.*, 1990; Lara – Ochoa *et al.*, 2010), asume una ventaja frente a los comensales, puesto que la adhesión de los patógenos es tan fuerte que aquellos que poseen una fijación pobre con los enterocitos son eliminados con el flujo intestinal (Lara – Ochoa *et al.*, 2010). Algunas cepas, como las de *E. coli* enteropatógenas y enterohemorrágicas, insertan la proteína Tir (Vidal *et al.*, 2007; Ahmad *et al.*, 2011; Murray *et al.*, 2014), al momento en que la intimina que se encuentra en la membrana externa bacteriana se une a este (Mundy *et al.*, 2005; Vidal *et al.*, 2007), la bacteria se adhiere firmemente a la mucosa produciendo cambios en las células (se da la formación de pedestales) (Smith *et al.*, 1990; Mundy *et al.*, 2005; Vidal *et al.*, 2007), desencadenando la fosforilación de la tirosina, α – actinina, vinculina y de la cadena ligera de la miosina; además la actividad de la fosfolipasa C eleva notablemente el diacylglicerol y el fosfato de inositol, a la vez activa la proteína Kinasa C, provocando así que el citoesqueleto tome otra disposición y cambie de forma (Rosenchine *et al.*, 1992; Jarvis y Kaper; 1996; Ahmad *et al.*, 2011),

de esta manera se afecta la estabilidad y el metabolismo de la célula. En este suceso se da un desbalance de iones y solutos por alteración de la absorción de estos y de la secreción intestinal, lo que conduce a la movilización de agua hacia la luz, de esta manera se manifiesta la diarrea, la pérdida de las microvellosidades es trágica, ocasionando diarrea por mala absorción (Vial *et al.*, 2007; Lara – Ochoa *et al.*, 2010). Esta forma de mecanismo también lo tiene el *Citrobacter rodentium*, patógeno natural del ratón, la cual comparte características genéticas similares con la *E. coli* (Mundy *et al.*, 2005).

Después de unirse firmemente, se secretan y liberan al medio toxinas (endotoxinas, exotoxinas y la toxina Shiga); el lípido A genera el consumo de los factores de coagulación, pirogenicidad, utilización del complemento y muerte por shock (Bhatia e Ichhpujani, 2008; Murray *et al.*, 2014), las subunidades B de la LT se unen al receptor GM₁ de la superficie celular del enterocito, la subunidad A interacciona con la Gs (proteína de membrana celular) y la STa se une a una proteína transmembrana relacionada a la guanilato ciclasa (Savarino *et al.*, 1993; Murray *et al.*, 2014) produciendo secreción intestinal por liberación de guanylate y adenylate ciclasa respectivamente, de esta manera aumentan el AMPc, lo que disminuye la absorción de sodio, cloro y agua, provocando así diarrea acuosa que se traduce en diarrea por mala absorción (Bhatia e Ichhpujani, 2008; Ahmad *et al.*, 2011; Brooks *et al.*, 2013; Murray *et al.*, 2014), la presencia de estas exotoxinas produce la liberación de prostaglandinas y citoquinas que aumentan la secreción de líquidos (Murray *et al.*, 2014), desencadenando inflamación local e hiperemia a partir del daño directo sobre las células (Jandhyala *et al.*, 2013).

La liberación de las hemolisinas se fundamenta en la importancia que posee el hierro para la invasión y colonización bacteriana (Litwin y Calderwood, 1985; Konhauser *et al.*, 2011; Brooks *et al.*, 2013), los sideróforos, como ya se mencionó, fijan el hierro a las bacterias mediante el transporte de proteínas de membrana unidas a moléculas de ATP, los patotipos de *E. coli* se caracterizan por utilizar gran variedad de quelantes que les permiten sobrevivir a la falta de hierro en el organismo hospedador puesto que existe una competencia por el hierro entre bacterias y el sistema inmunológico del hospedero (Pavia de Sousa, 2006; Konhauser *et al.*, 2011). Las hemolisinas permiten la captación de hierro mediante la lisis de eritrocitos lo que permite que se eleve la cantidad del elemento en el medio, es por esto que cuando la

disponibilidad del hierro es limitada, aumenta la síntesis de esta exotoxina (Stoebner y Payne, 1988; Waalwijk *et al.*, 1983), incluso Waalwijk *et al.* (1983) hallaron que la hemolisina puede volver una cepa no hemolítica de *E. coli* en virulenta tras realizar inyecciones sucesivas de esta toxina en ratones pues causa hemólisis y daño renal.

La toxina Shiga atraviesa la pared intestinal y se une a las plaquetas en el torrente sanguíneo para que estas lo transporten a los órganos diana (Muniesa *et al.*, 2012), la subunidad B se une al receptor globotriasol ceramida (Gb₃) presente en las vellosidades intestinales y en las células endoteliales renales (Ahmad *et al.*, 2011; Mueniesa *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2014), dentro de la célula la subunidad A atraviesa la membrana vacuolar a nivel de la red trans – Golgi, al salir del citoplasma se une al sitio ribosómico 28S de la subunidad 60S donde a su vez se liga con el acil – tRNA alterando la síntesis de proteínas y produciendo la muerte celular (Ahmad *et al.*, 2011; Muriesa *et al.*, 2012), de esta manera afecta células del túbulo renal proximal, del epitelio glomerular y del endotelio renal (Jandhyala *et al.*, 2013; Murray *et al.*, 2014). Se da una trombocitopenia causada por el consumo de plaquetas al haber un grave daño endotelial, especialmente en los glomérulos renales ocasionando de esta manera el síndrome urémico hemorrágico (Lara – Ochoa *et al.*, 2010; Puertas – García y Mateos – Rodríguez, 2010; Jandhyala *et al.*, 2013; Murray *et al.*, 2014). Este daño deriva en colitis hemorrágica que puede progresar a gangrenosa, según la magnitud de las lesiones en las biopsias de pacientes se observa una tumefacción de los glomérulos renales así como la pérdida de las fenestraciones, lesión renal aguda que desencadena en oliguria o anuria (Jandhyala *et al.*, 2013).

2.4 Clasificación

La clasificación más simple que se utiliza al hablar de *E. coli* es según la localización de la infección, se tienen a cepas intestinales y extraintestinales (Nataro y Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004), ambas se clasifican a su vez según las características epidemiológicas y signos clínicos causados por las diferentes cepas de una bacteria así como también según la interacción que tienen estas a través de sus factores de virulencia con las células del huésped, a esta clase de división se le conoce como patotipos. Dentro de las cepas intestinales existen 6 patotipos importantes ya mencionados anteriormente (Nataro y Kaper, 1998; Rodríguez – Ángeles, 2002; Kaper *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2004; Paiva de Sousa, 2006; Jhonson y Nolan *et al.*, 2009; Lara – Ochoa *et al.*, 2010; Alteri y Mobley, 2012, Jandhyala *et al.*, 2013), además el grupo de las cepas intestinales

también incluye a los patotipos productores de toxina Shiga (STEC) (Kaper *et al.*, 2004; Aidar – Ugrinovich *et al.*, 2007); dentro de este grupo existen aquellas que se adhieren a las células epiteliales, eliminan las microvellosidades y ocasionan la condensación de la actina del citoesqueleto, a estas se les denomina *E. coli* adherente y enfaceladora (AEEC) (Kaper *et al.*, 2004; Foster *et al.*, 2008), las que poseen ambas características se encuentran dentro del patotipo de las EHEC; y aquellas cepas AEEC que no producen toxinas Shiga son miembros del patotipo EPEC (Kaper *et al.*, 2004). Las cepas extraintestinales generalmente causan infecciones urinarias, característica que no es propia de ellos pues existen patotipos diarreogénicos (STEC y DAEC) involucrados también en infecciones urinarias (Kaper *et al.*, 2004; Puerta – García y Mateos – Rodríguez, 2010). La clasificación mediante serotipos y serogrupos se encuentra dentro de los patotipos, ya sean intra o extraintestinales (Nataro y Kaper, 1998; Rodríguez – Ángeles, 2002; Ahmad *et al.*, 2011), esta división será descrita con detenimiento más adelante.

Existe otra clase de división más compleja que lleva el nombre de grupos filogenéticos los cuales se han clasificado en base al desarrollo evolutivo que presenta la *E. coli*; a través de MLEE (Electroforesis de Enzima Multilocus) sobre la colección de *E. coli* en estudio, reconociéndose 4 grupos filogenéticos: A, B1, B2 y D, donde se ha indicado que A y B1 tienen características similares y son considerados como filogrupos hermanos, B2 es el ancestro y D fue el primero en dividirse (Wirth *et al.*, 2006; Tenaillon *et al.*, 2010), luego se realizó otra clasificación por MLST (Tipificación de las Diferentes Secuencias Multilocus) donde se obtuvieron otros filogrupos que no pudieron ser identificados anteriormente, estos son los filogrupos C, F y E (Tenaillon *et al.*, 2010). Dentro de cada uno de los filogrupos, se encuentran los patotipos patógenos diarreogénicos y no patogénicos, un ejemplo de ello es el serotipo O157:H7, perteneciente al patotipo EHEC y al filogrupo E (Tenaillon *et al.*, 2010; Donenberg, 2013).

2.4.1 Serotipificación

Como se mencionó anteriormente, los serotipos se encuentran descritos por los antígenos somático, capsular y flagelar, cada uno de estos serotipos pertenece a un patotipo definido. Los serotipos de *E. coli* provocan enfermedades importantes tanto en salud pública como en salud animal. La diarrea por esta bacteria se ha presentado en muchas especies animales como terneros, corderos, lechones, tuis, y demás especies de

mamíferos y aves (Nataro y Kaper, 1998; Rodríguez – Ángeles, 2002; Ahmad *et al.*, 2011).

En Inglaterra y Gales, los serotipos que pertenecen a los serogrupos O149, O8, O158, O147 y O157 fueron reportados como causa de enteritis hemorrágica, shock en el destete y enfermedad de los edemas en cerdos (Sheutz y Strockbine, 2005).

El serotipo O26:H11, pertenece al patotipo EPEC (Zhang *et al.*, 2000; Rodríguez – Ángeles, 2002; Sheutz y Strockbine, 2005), fue el primero en ser identificado serológicamente entre los años 1940 y 1950 en niños de países en vías de desarrollo (Vidal *et al.*, 2007; Lara–Ochoa *et al.*, 2010), el cuadro clínico principal se da en niños menores de 5 o 6 años de edad, se caracteriza por diarrea aguda con fiebre, vómito y síndrome de mala absorción (Rodríguez – Ángeles, 2002; Lara – Ochoa *et al.*, 2010; Puertas – García y Mateos – Rodríguez, 2010). Si bien es cierto que este serotipo es el que más se ha aislado, se han reportado otros que pertenecen también al serogrupo O26, estos contienen a los antígeno H2, H8, H21, H30, H32, H36 y H46 (Zhang *et al.*, 2000). Es productor de la toxina Shiga (Smith *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 2000) y enterohemolisinas Ehly1 y Ehly2, (Sheutz y Strockbine, 2005) siendo uno de los serotipos que causa el síndrome urémico hemolítico y colitis hemorrágica (Zhang *et al.*, 2000). Posee el mecanismo de adhesión y enfacelamiento donde el principal mediador es el BFP que origina microcolonias agrupadas en el borde en cepillo las cuales provocan el enfacelamiento y cambio de morfología de las vellocidades (Vidal *et al.*, 2007; Ahmad *et al.*, 2011). Todos los serotipos incluyendo el O26:H11 se caracterizan por presentar la intimina y 4 proteínas más (EspA, B, D y Tir) para poder realizar este mecanismo (Sheutz y Strockbine, 2005, Murray *et al.*, 2014).

Mercado *et al.* (2004) reportaron el O26:H11 en muestras fecales de guanacos de dos meses de edad que padecían de diarrea acuosa severa; además se han notificado reportes que indican que serogrupos O136, O78, O8 y O60, se encuentran relacionados a diarreas en neonatos de alpacas (SENASA, 2011). Luna *et al.*, (2012), del mismo modo, indican esa posibilidad de hallar cepas intestinales patógenas de *E. coli* en camélidos sudamericanos, ellos encontraron cepas de EPEC en las crías de estos animales, así como también, cepas de EHEC a través de la genotipificación por PCR múltiple para identificar factores de virulencia como BFP, Stx1, Stx2, entre otros. El estudio de Aidar – Ugrinovich *et al.* (2007) que consistió en definir los marcadores de virulencia, serotipos y la ocurrencia de cepas EPEC y EHEC también determinaron en

mayor proporción la presencia de O26:H11, O123: H11 y O177:H11 como serotipos EPEC pero en muestras fecales de terneros provenientes de granjas de São Paulo – Brazil los que podrían estar implicados en severas infecciones en humanos en dicha ciudad. Otros serotipos pertenecientes a las cepas enteropatógenas de *E. coli* son O26: H⁻, O55: H7, O55: H10, O55: H⁻, O111: H⁻, O128ab: H2 (Sheutz y Strockbine, 2005) y O127:H4 (Smith *et al.*, 1990; Thu *et al.*, 2008)

El serotipo O157:H7, pertenece a las EHEC y es reconocido como la fuente principal de una enfermedad gastrointestinal severa, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH) (Jarvis y Kaper, 1996; Fields *et al.*, 1997; Sonntag *et al.*, 2004; Rigovelo *et al.*, 2006; Lara – Ochoa *et al.*, 2010; Bosilevac y Koochmaraie, 2011; Pradel *et al.*, 2015). Es el serotipo más reconocido en este grupo, fue aislado de brotes epidemiológicos de enfermedades intestinales en todo el mundo, sobre todo en países industrializados, donde se le relaciona frecuentemente con el SUH el cual afecta a individuos jóvenes y de avanzada edad (Rodríguez – Ángeles, 2002; Lara - Ochoa *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2011; OMS, 2011; Jandhyala *et al.*, 2013). Se caracteriza por liberar la toxina shiga o Verocitotoxina subtipos Stx1/VT1 y Stx2/VT2 (Jarvis y Kaper, 1996; Fields *et al.*, 1997; Rodríguez – Ángeles, 2002; Madigan *et al.*, 2010; Luna *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2014). Posee el gen *eae*, que al igual que en EPEC, permite el desarrollo del mecanismo de adhesión y enfacelamiento (A/E) de las microvellosidades (Aidar - Ugrinovich *et al.*, 2007; Foster *et al.*, 2008; Thu *et al.*, 2008., Ahmad *et al.*, 2011; Jandhyala *et al.*, 2013). De la misma manera que los serotipos pertenecientes a la *E. coli* enteropatógena, poseen la enterohemolisina la cual es codificada por el plásmido p157, a estas cepas que contienen este mecanismo de patogenicidad y al plásmido se les conoce como EHEC típicas, aquellas cepas que no poseen dicho mecanismo y pueden o no poseer al plásmido toman el nombre de EHEC atípicas (Rodríguez – Ángeles, 2002).

A los serotipos productores de toxina shiga que no son O157:H7 se les denomina STEC no – O157:H7, estos se diferencian del serotipo en cuestión en que este último afecta solo a humanos y los demás tanto a humanos como a animales, ejemplo de ello son O111:H8, O118:H16 (Rigobelo *et al.*, 2006; Manning, 2010), O177:H11 (Aidar – Ugrinovich *et al.* 2007; Timm *et al.*, 2007), O110:H28 (Döpfer *et al.*, 2010), O74:H39 (Fernández *et al.*, 2010), O8:H19 (aislado de carne picada, hamburguesas y quesos de pasta blanda en Argentina) (Rivero *et al.*, 2004; Friesema *et al.* 2015), O2:H6 (heteropatógeno, puede afectar tanto el tracto gastrointestinal como al urinario, fue el

primer híbrido virulento de *E. coli* en identificarse) (Bielaszewska *et al.*, 2014). Esto no significa que la O157:H7 no se encuentre presente en los animales pues es parte de la flora normal de bovinos, ovinos y cerdos. Normalmente estos animales son los que diseminan el patógeno en sus heces, sobre todo los terneros, que tienen un porcentaje de diseminación del 5 – 10% del serotipo (Manning, 2010). En lo que respecta a camélidos sudamericanos Silvera *et al.* (2012) realizaron un estudio en Perú para determinar la presencia de O157:H7 de neonatos de alpacas con y sin diarrea a través de la caracterización de factores de virulencia (gen *eae* y toxinas Stx 1 y Stx 2), el resultado fue negativo a este serotipo a pesar que mencionan que en el estudio de Arainga *et al.* (2008) hallaron cepas probables de O157:H7 pues encontraron la presencia de ambas toxinas, Stx 1 y Stx 2, en un 57 y 60% respectivamente, sin embargo el gen *eae* y la toxina Stx 2 se identificaron en el estudio de Silvera sugiriendo que los camélidos pueden ser reservorios de *E. coli* productora de toxina Shiga.

Otros serotipos aislados de humanos en los distintos brotes epidemiológicos de EHEC encontramos a: O2:H29, O2:H44, O6:H41, O18:H?, O21:H8, O22:H5, O85:H10, O111:H7, O137:H6, O126:H27 (Sheutz y Strockbine, 2005), O145:H25 (Sonntag *et al.*, 2004).

Otro serotipo, el O104:H4 que pertenece al patotipo EAEC el cual se relaciona con inmunosupresión pues en salud pública se ha descrito que las personas con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) se encuentran predispuestas a este grupo patógeno (Manning, 2010; Jhandyala *et al.*, 2013). El cuadro típico cursa con diarreas líquidas mucosas sin sangre de color verde, vómitos y fiebre; es la causa más frecuente de la diarrea del viajero (Rodríguez – Ángeles, 2002; Jandhyala *et al.*, 2013). Sin embargo, a través de la transmisión genética horizontal algunas cepas pertenecientes a este serotipo han adquirido el gen que codifica la toxina Stx2 por lo que se le considera STEC y es uno de los patógenos que causa el SUH (Blanco, 2012; Muniesa *et al.*, 2012; Jhandyala *et al.*, 2013; Bielaszewska *et al.*, 2014); se diferencia con el O157:H7 en que este último causa lesiones de adherencia y enfacelamiento, el O104:H4 tiene un patrón de adherencia agregativa en forma de “ladrillo apilado” (Muniesa *et al.*, 2012; Jhandyala *et al.*, 2013; Bielaszewska *et al.*, 2014), este patrón de adherencia fue descrito *in vitro* en ensayos con células Hep - 2, donde se observó que las bacterias se aglutinaban notablemente tanto sobre la superficie de las células como en la superficie de la base de vidrio en placa (Rodríguez – Ángeles, 2002; Ahmad *et al.*, 2011).

Dentro de los factores de virulencia propios del O104:H4 como de los demás serotipos pertenecientes a las EAEC se encuentra la fimbria AAF 1 implicada en la adherencia hacia las células Hep – 2 y en la hemaglutinación de eritrocitos, esta fimbria es codificada por el gen *aggA* (Rodríguez – Ángeles, 2002; Blanco, 2012; Muniesa *et al.*, 2012), *in vivo* se puede observar que promueve la adherencia de la *E. coli* a la mucosa intestinal y la formación de un biofilm de un espesor considerable sobre la superficie mucosa que recubre el epitelio intestinal, de esta manera se produce una adherencia persistente a la mucosa promovida por la fimbria de adherencia agregativa (Jandhyala *et al.*, 2013; Murray *et al.*, 2014). Así mismo, las proteasas séricas de autotransporte de las *Enterobacteriaceae* (SPATEs) modulan la respuesta inmune, esta es encontrada frecuentemente en todas las cepas EAEC como en las demás *E. coli* diarreogénicas (Jandhyala *et al.*, 2013). Otros de los factores presentes son las enterotoxinas termolábiles y/o termoestables (Jandhyala *et al.*, 2013; Murray *et al.*, 2014), las que tienen una acción muy parecida a las enterotoxinas de las cepas ETEC (Jandhyala *et al.*, 2013).

Tobías *et al.* (2015) identificaron los serotipos O15:H18 y O175:H31 de las EAEC, en muestras de diarreas de infantes menores a 5 años en su investigación sobre la relación de las *E. coli* diarreogénicas y otros agentes enteropatógenos con la severidad de los signos clínicos de los pacientes, una de sus conclusiones fue que la asociación de EAEC y rotavirus pueden aumentar la severidad de la enfermedad. Otros serotipos comúnmente aislados son: O3:H2, O15:H18, O44:H⁻, O44:H18, O86:H⁻, O111:H12, O111:H21, O125:H9 y O125:H19 (Sheutz y Strockbine, 2005).

2.5 Diagnóstico

2.5.1 Método de Aislamiento e identificación

Los medios adecuados para el crecimiento de agentes bacterianos como *E. coli* son el agar MacConkey, agar Sangre o agar Eosina – Azul de metileno, debido a su capacidad de fermentar, es decir, convertir los sustratos ricos en carbohidratos y azúcares en energía, siendo los más utilizados los dos primeros; después de haber sido sembrado en el medio de elección se incuban por 24 horas a 37°C en un ambiente anaeróbico (Nataro y Kaper, 1998; Bhatia e Ichhpujani, 2008; Manning, 2010). Las colonias pueden mostrar un crecimiento liso o rugoso esto depende de la polimerización del antígeno O; la de forma lisa (con diámetro de 2 – 3 nm) son convexas, color gris,

húmedas, relucientes y con bordes definidos, en caldo de cultivo desarrollan cadenas laterales de polisacáridos, por su parte, la cepa rugosa (de diámetro 1 – 5 nm) son planas, opacas, secas y con bordes no definidos (Sheutz y Strockbine, 2005), generalmente el patrón rugoso pertenece a bacterias de la flora intestinal normal, lo contrario ocurre con las cepas lisas, las cuales se han aislado e identificado en crías de alpacas entre 1 a 2 meses (IVITA, 1991); en caso de agar sangre las colonias se encuentran rodeadas por un halo de hemólisis (IVITA, 1991; Bhatia e Ichhpujani, 2008). Luego se escogen colonias lactosa positivas o negativas (EIEC) dependiendo de lo que se quiera descartar (Rodríguez – Ángeles, 2002), para después realizar las respectivas pruebas bioquímicas que nos confirmarían que nos encontramos frente al microorganismo en cuestión (Rodríguez – Ángeles, 2002; Manning, 2010). Por su parte, para que el antígeno H se exprese es necesario un medio especial, el agar semisólido pues las cepas pierden movilidad después de su aislamiento (Zhang *et al.*, 2000), este procedimiento se explicará con detenimiento en materiales y métodos.

En caso de sospecha de *E. coli* O157:H7 el agar de elección es el de MacConkey – sorbitol, ya mencionado anteriormente (Manning, 2010; Puertas – García y Mateos - Rodríguez, 2010) donde se eligen 10 colonias sorbitol negativo las cuales tienen la característica de ser incoloras, en caso se quiera lograr aislar con mayor certeza esta cepa, se puede utilizar el medio de soya tripticaseína con 40 ng/ml de vancomicina y 50 ng/ml de cefaxima para realizar un enriquecimiento de 4 horas, para que de esta forma pueda crecer este serotipo mas no otras *E. coli* (Rodríguez – Ángeles, 2002).

2.5.2 Método de Serotipificación

Es utilizado con fines de estudios epidemiológicos para la determinación de distintas serovariedades en diferentes zonas geográficas, para la descripción de brotes y hallar la fuente de infección (Caugant *et al.*, 1985; Caffer-Terragno, 2001). Se realiza por ensayos de aglutinación o cualquier otro método que capte la interacción específica entre el anticuerpo y el antígeno. La importancia radica en que conociendo el serotipo se obtendrá información sobre la clase de *E. coli* que está ocasionando el brote epidemiológico, además encontramos diversas cepas difíciles de identificar mediante medio de cultivo o pruebas bioquímicas, las cuales se pueden definir a través de este método (Manning, 2010).

El suero para la obtención de los anticuerpos es producido a partir de conejos inmunizados (Orskov y Orskov 1975; Orskov *et al.*, 1977; Tiba *et al.*, 2011), de estos se toma la cepa y se realiza un cultivo el cual se procesa a 100 °C por 2 horas, luego se enfrenta al antígeno con el pool de antisueros (incluyendo los que poseen las reacciones cruzadas) y se verifica con cuál/es de ello/s es positivo (Orskov y Orskov 1975; Orskov *et al.*, 1977).

La nomenclatura varía según el tipo de antígeno presente en la cepa estudiada, por ejemplo se puede designar como O18ac:K1:H7 u O111:H2, esta última forma es la más frecuente (DebRoy *et al.*, 2011).

2.5.3 Otras técnicas

Frecuentemente se utiliza la biología molecular para hallar una cepa específica mediante la amplificación o hallazgo de genes que traducen alguna proteína o molécula en especial, entre los métodos más usados en este campo se tiene al *colony blot* y a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Rodríguez – Ángeles, 2002).

El *colony blot* utiliza sondas, las cuales son fragmentos de ADN que tienen la capacidad de codificar algún factor de virulencia en especial y pueden encontrarse marcadas radioactivamente con ³²p o no radioactivamente con digoxigenina o biotina; este ADN es transferido de una colonia de bacterias a una fase sólida (nylon, papel filtro o nitrocelulosa) para luego ser hibridado (Gicquelais *et al.*, 1990; Rodríguez – Ángeles, 2002). Al culminar la hibridación se expondrá la colonia a rayos X para obtener una imagen radiográfica que nos indicará la clase de factor de virulencia según las sondas encontradas (Nataro y Kpaer, 1998). En la actualidad, para la *E. coli* existen sondas específicas para la fimbria Bfp de EPEC, para la toxina termolábil (LT) y termoestable (ST) del grupo ETEC y para la enterohemolisina (hlyA) de EHEC, entre otros factores de virulencia característico de las cepas (Nataro y Kaper *et al.*, 1998; Rodríguez – Ángeles, 2002).

La PCR es una hibridación en fase líquida donde se utilizará el ADN de la muestra con el iniciador (un fragmento específico de un gen relacionado a la

patogenicidad de las cepas de la bacteria en estudio), primero la cepa se siembra por estría y se incuba durante 24 h; después se resuspenden 5 colonias en 0.2 ml de agua y se somete a ebullición para desnaturalizar el DNA; de dicha suspensión se toma una alícuota para el tubo donde se realiza la PCR, los reactivos necesarios para este método son adenina, timina, citocina, guanina, MgCl₂, iniciadores y enzima Taq polimerasa (Rodríguez – Ángeles, 2002). Existen varias clases de PCR una de ellas es el PCR – RFLP “*Restriction Fragment Length Polymorphism*” (Castaño y Bilbao, 1997; Sonntag *et al.*, 2004; Tiba *et al.*, 2011) el cual consiste en dos fases, primero se realiza una amplificación por PCR del gen en cuestión para luego cortar en fragmentos el producto de la amplificación a través del uso de enzimas de restricción o endonucleasas (Castaño y Bilbao, 1997; Sonntag *et al.*, 2004). Existen estudios que indican la utilidad de este método, Fields *et al.* (1997) y Zhang *et al.* (2000) lo desarrollaron para identificar antígenos flagelares a partir del gen *fliC*, el primero tenía como objetivo al H7 para hallar el serotipo O157:H7 y el segundo al antígeno flagelar H11 a partir de 57 cepas que poseían al grupo O26 para así identificar al serotipo O26:H11, ambos demostraron que este método supera a la serotipificación clásica del antígeno flagelar pues se pueden hallar aquellos antígenos flagelares que pertenecen a cepas inmóviles y, por ende, es difícil de identificar la clase de antígeno flagelar que poseen, además en el estudio realizado por Ramos *et al.* (2006) se comprobó la rapidez de este método molecular en comparación con la serotipificación por aglutinación pues el PCR – RFLP brinda resultados en solo 2 días, en cambio el método serológico requiere un tiempo de una semana para dar a conocer los resultados. Por su parte, Badri *et al.* (2010) comparó este método con el de secuencia de análisis del gen *fliC* y concluyó que este último también es seguro, rápido y puede determinar aquellas cepas inmóviles o cuyo flagelo no se desarrolla.

2.6 Importancia en salud pública

El ambiente principal en el que se desarrolla la *Escherichia coli* es el tracto intestinal inferior de los mamíferos, aves, y el hombre. Pertenecce a la flora bacteriana normal actuando como comensal, esta microbiota comensal contiene cerca de 400 especies de microorganismos los cuales conviven armónicamente en el intestino (Kaper *et al.*, 2004; Paiva de Sousa, 2006; Wirth *et al.*, 2006; Puerta – García y Mateo – Rodríguez, 2010; Tenaillon *et al.*, 2010; Jandhyala *et al.*, 2013). La *E. coli* ingresa al tracto intestinal en la fase de lactancia de los neonatos, se adhiere a la mucosa del

intestino grueso y una vez establecida en el lugar puede persistir indefinidamente a pesar de representar solo el 0.1% de la población bacteriana total, en el ser humano el intestino se encuentra colonizado después de 40 horas del nacimiento (Kaper *et al.*, 2004, Paiva de Sousa, 2006, Tenaillon *et al.*, 2010). Sin embargo, por la alteración del microambiente puede generar enfermedades gastrointestinales y/o extraintestinales (septicemia, infección de las vías urinarias, bacteremia, meningitis, entre otras), además se asocia a la presencia de los patotipos mencionados anteriormente, los cuales son potencialmente patógenos para la salud del humano (Nataro y Kaper, 1998; Rodríguez – Ángeles, 2002; Manning, 2010; Ahmad *et al.*, 2011; Alteri y Mobley, 2012). Las cepas patógenas intestinales desencadenan enfermedades diarreicas las cuales causan, a nivel mundial, cerca de 2 – 3 millones de muertes al año, dentro del grupo poblacional susceptible se encuentran los niños de entre 0 – 5 años debido a la gran facilidad de ingestión de alimentos y agua contaminada (Manning, 2010).

Las cepas productoras de la toxina Shiga (STEC), dentro de las cuales se encuentran las correspondientes al patotipo EHEC y algunas cepas EPEC, pueden afectar a toda la población sin distinción, sin embargo los grupos más susceptibles son los niños en edad preescolar y las personas de tercera edad (Rodríguez – Ángeles, 2002; Döpfer *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2010; Lara - Ochoa *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2011; OMS, 2011; Jandhyala *et al.*, 2013), las STEC pueden producir colitis gangrenosa con la subsiguiente perforación del intestino y desarrollar sepsis y/o peritonitis, además de ocasionar el SUH (Constantiniu, 2002; Rodríguez – Ángeles, 2002; Döpfer *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2010; Lara - Ochoa *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2011; OMS, 2011; Jandhyala *et al.*, 2013; Pradel *et al.*, 2015). Dentro de las EHEC la *E. coli* O157:H7 es el serotipo más conocido por ser uno de los agentes principales que causan el SUH, este consiste en una triada: anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia renal (Jarvis y Kaper, 1996; Rivero *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2011), esta última provoca una tasa de 3 – 5% de mortalidad en niños que padecen el síndrome, las secuelas crónicas son graves y se han reportado en un 20% de niños con SUH cuyos signos clínicos varían desde una insuficiencia renal crónica hasta alteraciones neurológicas (Jandhyala *et al.*, 2013; Murray *et al.*, 2014). El hecho de que los bovinos y ovinos sean la fuente más común de este serotipo y demás STEC (Constantiniu, 2002; Hussein, 2006; Friesema *et al.* 2015) y que la carne de estos animales sea consumida a nivel mundial, favorece la presentación de brotes infecciosos relacionados al consumo

de carne poco cocida o “a término medio” pues la población no toma en cuenta o desconoce que durante el sacrificio muchas veces la carcasa es contaminada con el contenido intestinal en el proceso de eviscerado (Rivero *et al.*, 2004; Aidar – Ugrinovich *et al.*, 2007; Döpfer *et al.*, 2010; Lara – Ochoa *et al.*, 2010; Manning, 2010; Madigan *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2011).

Es así, que en el 2003 se realizó un estudio de 6584 muestras de carne molida, donde se reportaron 0.03% (20/6584) que dieron positivo al serotipo O157:H7 representando estas un riesgo para la salud de las personas que consuman esta carne (Madigan *et al.*, 2010); así mismo, Timm *et al.* (2007) identificaron una serie de serotipos que poseían los genes Stx1, Stx2 y/o *eae* al realizar un estudio sobre la prevalencia de STEC en carne y ganado vacuno proveniente de granjas de Rio Grande do Sul – Brazil, demostrando una vez más que este ganado es uno de los principales reservorios de los serotipos productores de toxina Shiga, entre los serotipos hallados se encontraban O177:H11, O113:H21, O91:H21, O112:H2, O22:H8, O10:H14, entre otros; no solo los productos cárnicos pueden encontrarse contaminados con la bacteria, también se debe poner atención especial al procesamiento que se les da a los vegetales pues en el 2006 hubo un brote de O157:H7 en Estados Unidos de América (USA) relacionado al empaque de frescas en un establecimiento (Manning 2010, Murray *et al.*, 2014), se aisló de rábanos, lechugas, alfalfa, en mayonesas, leche y jugo de naranja (Madigan *et al.*, 2010). Así mismo, en el periodo entre 1982 y 1993 se identificaron alrededor de 20 brotes de este serotipo en dicho país, fueron 1509 personas que enfermaron, donde se hospitalizaron a 346 pacientes habiendo 86 casos de SUH de los cuales 19 perecieron; solo en el año de 1993 se encontraron 13 brotes de O157:H7 y 30 en 1994 (Sheutz y Strockbine, 2005); en 1999 Mead *et al.* estimaron que el número de enfermedades de origen alimentario dentro de los cuales se encuentra el serotipo O157:H7 de *E. coli* fue de 13.8 millones de casos reportados lo que demostró un incremento significativamente alto frente a estudios anteriores, además manifestaron que de 73480 casos reportados de este serotipo cerca de 63000 se dan a causa de alimentos; de 36740 casos reportados de los STEC no – O157, 31229 se dan por ETAs (enfermedades de transmisión alimentaria).

Los serotipos no – O157 producen gran cantidad de brotes en países como Argentina, Australia y Alemania donde aproximadamente el 80% de los casos atribuidos a las enfermedades por el patotipo enterohemorrágico no son causados por el

O157:H7 (Fernández *et al.*, 2010; Mannin, 2010); en Finlandia, Bélgica y la República Checa, también suceden casos similares, donde incluso las enfermedades producidas por los serotipos no – O157 y del serotipo O157: H⁻ son responsables de un número mayor de casos reportados que la O157:H7 (Manning, 2010). Bosilevac y Koohmaraie (2011) muestrearon carne proveniente de un establecimiento comercial y utilizando el método de PCR identificaron a los genes *stx1* y *stx2*, *eae*, *chuA*, y otros que ponen en manifiesto la presencia de cepas STEC (O103:H21, O103:H2, O145:H28, entre otros) en la carne destinada al consumo humano y, a pesar que la prevalencia fue relativamente baja (24.3% a más) no se descarta el riesgo que puede presentar para la salud de los consumidores pues pueden causar el SUH. El O104:H4 es uno de los no – O157 que también causa el síndrome, fue el agente principal, entre mayo y julio del 2011, que causó un brote de SUH en Europa, uno de los brotes más impactantes fue en Alemania, donde de 3842 casos reportados, 2987 fueron confirmados por diagnóstico de laboratorio como positivos al O104:H4, 18 fallecieron y 855 fueron los casos de SUH (Blanco, 2012; Muniesa *et al.*, 2012; Jandhyala *et al.*, 2013; Bielaszewska *et al.*, 2014; Murray *et al.*, 2014). En otros brotes de SUH, en Japón se aislaron los serotipos O111:H⁻, O?:H19 y O145:H⁻, en República Checa, USA e Irlanda la O26:H11, en Francia la O103:H2, en USA la O104:H21, en Australia, USA, Francia, España e Italia la O111:H⁻, la O113:H21 en Australia, y el serogrupo O119 en Francia (Sheutz y Strockbine, 2005).

Dentro de casos reportados de otros patotipos se encuentra el brote de O166:H?, perteneciente a EAC en Japón, a este brote se le asoció la presencia del gen que codifica a la EAST 1 y, como se encuentra en un gran porcentaje de los serotipos diarreogénicos, se ha encontrado también en casos de diarreas en niños españoles, pero estos no eran relacionados al patotipo de EAEC (Sheutz y Strockbine, 2005). En 1969 se aisló, el serotipo O127:H6 a partir de diarreas de infantes relacionado a un brote de EPEC en Tauton, Inglaterra, las personas afectadas presentaron diarrea acuosa, fiebre, vómitos y pérdida de fluidos (Nataro y Kaper, 1998).

2.7 Colibacilosis en alpacas

2.7.1 Epidemiología

La mortalidad en las crías del ganado alpaquero ocasiona pérdidas económicas, tanto en gastos en el tratamiento como pérdida de la condición corporal del animal,

fallas en el crecimiento afectando la actividad pecuaria del poblado, entre las enfermedades que perjudica la sanidad de estos animales se encuentra la colibacilosis (Ameghino y DeMartini, 1991), esta asume en crías de alpacas cerca del 15% de morbilidad y 20% de mortalidad en ganado alpaquero; las colonias lisas y mucoides de la *E. coli* se han identificado en crías de 1 – 2 meses con signos diarreicos o muerte asociada a la enfermedad (IVITA, 1990; Ameghino y DeMartini, 1991; Ramírez y Ellis, 1988; SENASA, 2011), en cambio las rugosas se han aislado a partir de la flora intestinal normal de animales y humanos (Ramírez y Ellis, 1988). Las cepas EPEC asumen diarreas recurrentes en estas crías a través de sus factores de virulencia (*eae* y BFP), en cambio las EHEC ocasionan lesiones sumamente graves que pueden conllevar a la muerte (Ramírez y Ellis, 1988; Luna *et al.*, 2012).

2.7.2 Signos clínicos

La *Escherichia coli* como ya se mencionó, es uno de los agentes oportunistas más importantes para la presentación de diarreas en crías, las deficientes condiciones medioambientales y la baja producción lechera de la madre son factores predisponentes para que se presenten los signos clínicos (Moro, 1965; IVITA, 1987). Los crías presentan una marcada depresión y anorexia, en la zona perianal se pueden observar manchas de heces diarreicas (IVITA, 1987; IVITA, 1988; Ramírez y Ellis, 1988; IVITA, 1990; Ameghino y DeMartini, 1991), las heces pueden progresar de color blanquecino, a blanco amarillento o verdoso, y persistir por 5 a 20 días, abdomen abultado, temperatura normal y disminución de peso (Moro, 1965; IVITA, 1987; Ameghino y DeMartini, 1991); algunas veces las crías poseen un apetito depravado y consumen tierra o cualquier otra partícula extraña (IVITA, 1987; Ameghino y DeMartini, 1991), en ocasiones la deshidratación y mala condición del animal llega a niveles notablemente altos y provocan la muerte de la cría a causa de la diarrea profusa (Ameghino y DeMartini, 1991).

2.7.3 Lesiones

A la necropsia, se observa claramente el pobre estado de carnes de la cría (IVITA, 1987), el tracto digestivo es el más afectado, el compartimento estomacal puede presentar petequias y evidencia de hemorragias en diferentes grados (Ameghino y DeMartini, 1991), el intestino se encuentra dilatado y posee abundante líquido pero

ausencia de gases en el lumen (Ramírez y Ellis, 1988; IVITA, 1990; Ameghino y DeMartini, 1991).

Foster *et al.* (2008) realizaron un estudio con 3 crías de alpacas de 7 días, 5 semanas y 10 días de edad respectivamente, donde histopatológicamente se determinaron lesiones en el intestino delgado del primer y segundo animal; en el animal de 10 días las alteraciones se restringieron solo al intestino grueso. En el intestino delgado de la alpaca de 7 días se observó infiltración de neutrófilos con hemorragia leve en la lámina propia, la mucosa se encontraba lisa en algunas áreas que presentaban colonias cocobacilares adheridas a las microvellocidades de los enterocitos; en el segundo animal el intestino se encontraba severamente dilatado con abundante contenido acuoso en la luz, las células mostraban cambios autolíticos, en ambos animales se encontraron protozoos como el *Criptosporidium* spp adheridos a la mucosa, además en la alpaca de 5 semanas se detectaron toxinas de *Clostridium perfringens* a través de la prueba de ELISA. En la tercera cría se observó una atrofia marcada de microvellocidades en el intestino grueso y también se detectaron toxinas (épsilon y alpha) de *Clostridium* sp. En las 3 crías se pudieron determinar lesiones asociadas a cepas AEEC y STEC.

Palacios *et al.* (2005) estudiaron 48 muestras intestinales de neonatos de alpacas que padecían de procesos diarreicos, las muestras provenían de la Estación Experimental Maranganí y del poblado alpaquero Nuñoa en Puno; del total de animales 7 poseían lesiones asociadas a *E. coli* coincidente con el estudio anterior de Foster *et al.*, los intestinos mostraban acumulación severa de líquido en el lumen y una moderada a severa hiperemia, a nivel histopatológico, las lesiones variaron: en 3 muestras las vellocidades del yeyuno se encontraban alargadas y se observó una leve a moderada hiperemia e infiltración linfoplasmática con una ligera hiperplasia de las células caliciformes, en cambio las 4 muestras restantes tenían las vellocidades disminuidas de tamaño y la infiltración linfoplasmática e hiperemia eran moderadas además se presentaba descamación epitelial exponiendo la membrana basal. El resto de animales mostraron lesiones compatibles con *Clostridium perfringens*, en su mayoría, asociados con *Eimeria* sp, otros dos casos mostraron lesiones de *Criptosporidium* sp y no se descartan infecciones mixtas entre virus y bacterias.

2.7.4 Diagnóstico diferencial

La colibacilosis puede presentarse como una enfermedad aislada o en conjunto con otros agentes patógenos, es por esto que se habla del complejo entérico neonatal en el cual se encuentra el *Clostridium* sp, rotavirus, *Eimeria* spp, entre otros (Palacios *et al.*, 2005; Rosadio *et al.*, 2012b). Todos estos agentes por separado cursan con signos clínicos semejantes a la colibacilosis, la enterotoxemia es causada por *Clostridium perfringens* generalmente subtipo A (Ramírez y Ellis, 1988; Rosadio *et al.*, 2012a; Rosadio *et al.*, 2012b), bacilo grampositivo anaerobio facultativo que tiene la capacidad de formar esporas, se encuentra como comensal en el tracto digestivo de los mamíferos (Ramírez y Ellis, 1988; Rosadio *et al.*, 2012a). La toxina liberada por este tipo es la α , los demás subtipos (B, C, D y E) liberan las otras toxinas β , ϵ , ζ , entre otras (Rosadio *et al.*, 2012a). Existe algunas condiciones en el microambiente intestinal que favorece la aparición de esta especie bacteriana, entre estas se encuentran tanto la *E. coli* como la *Eimeria macusaniensis* ya que producen daño en la mucosa intestinal (Rosadio *et al.*, 2012a). Entre los signos clínicos se encuentran anorexia, postración, abdomen abultado, signos nerviosos como convulsiones o muerte súbita en crías de 1 semana de edad (Ramírez y Ellis, 1988). Se diferencia claramente de la colibacilosis por la presencia frecuente de heces diarreicas en esta última (IVITA, 1988)

Las infecciones virales por rotavirus, son predisponentes a múltiples infecciones bacterianas secundarias aumentando la intensidad y severidad del cuadro clínico (Ameghino y DeMartini, 1991), en el estudio desarrollado por Benfield *et al.* (1988) utilizaron cerdos neonatos de 3 días de edad separados en 4 grupos experimentales: los inoculados con rotavirus y ETEC individualmente, los inoculados con ambos agentes en conjunto y un grupo control, aquellos que fueron inoculados con ambos tuvieron una diarrea severa que conllevó a la muerte de los animales, en cambio aquellos que fueron enfrentados solo con uno de ambos agentes sobrevivieron a la infección, con respecto a los camélidos sudamericanos Morales *et al.* (2007) recolectaron las heces de 320 neonatos de alpacas y evaluaron la relación entre este virus y la *E. coli* concluyendo que parte de las causas de los cuadros diarreicos en estos animales se da por la acción de ambos patógenos en conjunto agravando los signos clínicos pero no aumentando la mortalidad como en otras especies animales.

Las coccidias como la *Eimeria macusaniensis* causan diarreas al igual que la *E. coli* y pueden ser agentes que se encuentren asociados a infecciones bacterianas, generalmente afectan a crías de 25 días de edad (Ameghino y DeMartini, 1991). El

Criptosporidium parvum también es un agente predisponente de diarrea en crías; Villacorta *et al.* (2009) utilizaron muestras fecales de neonatos de alpacas con y sin diarrea para determinar a través de la prueba de Zhiel Neelson Modificado (ZNM) aquellos animales que eran positivos a dicha coccidia, los resultados demostraron que los positivos tienen mayores posibilidades de padecer diarreas que los negativos y pueden predisponer también a infecciones bacterianas y virales secundarias. La criptosporidiosis como tal produce los mismos signos clínicos que la colibacilosis con excepción que los animales presentan fiebre (Villacorta *et al.*, 2009).

2.7.5 Prevención y control

La colibacilosis, a diferencia de la enterotoxemia, afecta a animales que se encuentran en bajas condiciones cárnicas y en estrés constante (IVITA, 1987; Ameghino y DeMartini, 1991) es por esto que se recomienda que los dormideros deben permanecer en lo posible secos y libres de humedad, aquellos animales que decaigan o comiencen con cuadros diarreicos deben ser separados del resto de camélidos, además seleccionar zonas de parición con suficiente alimento para que las madres ingieran lo correcto y puedan producir leche, las hembras que no la produzcan deben ser separadas del ganado y beneficiadas (Moro, 1965; IVITA, 1987).

Se podría utilizar una vacuna en las madres la cual posee como antígeno al pili, esto se realiza para que se dé una transferencia de inmunoglobulinas a las crías mediante el consumo de calostro (Ramírez y Ellis, 1988); Salcedo (1988) inoculó una bacterina a 30 alpacas preñadas a base de 6 cepas patógenas de *E. coli* que afectan a las crías, otras 30 fueron utilizadas como grupo control por ende solo se les tomó muestra de sangre, a las crías por nacer de todas las alpacas también se les extrajo sangre al nacimiento, en sus resultados indicó que los títulos más altos los obtuvieron aquellas madres con sus respectivas crías que habían sido inoculadas en la preñez concluyendo que la transferencia de anticuerpos de madre a cría fue positiva, sin embargo estos anticuerpos eran aglutinantes lo que no garantizaba un efecto protectorio contra la colibacilosis. Además, la cloropormazina es una droga efectiva en la inactivación de la cAMP celular la cual es alterada por la presencia de las enterotoxinas de la bacteria, también se debe recordar en la reposición de líquidos para el mejoramiento rápido del animal (IVITA, 1988; Ramírez y Ellis, 1988).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución y periodo de duración

El muestreo se realizó en tres comunidades alpaqueras de Cerro de Pasco (Ninacaca, Huayllay y Cochamarca). El aislamiento se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología del IVITA Mantaro durante los meses de enero, febrero y marzo del año 2014, el procedimiento de serotipificación se ejecutó en la Universidad Autónoma de México (UNAM).

3.2 Diseño experimental

3.2.1 Tamaño de muestra

El tipo de estudio fue de carácter descriptivo transversal prospectivo. Las muestras fueron recolectadas de 150 crías de alpacas. Los criterios de inclusión considerados fueron: crías menores a 4 meses de edad que presentaran cuadro diarreico.

3.2.2 Procedimiento de muestreo

La toma de muestra se realizó de crías de alpacas, , a través de hisopados rectales. Estos hisopos fueron rotulados y conservados en tubos con medios de transporte bacteriano stuart (Merck) aproximadamente a 4°C. hasta su remisión y posterior procesamiento en el laboratorio.

3.2.3 Cultivo y aislamiento bacteriano

Cada muestra obtenida se sembró por separado en placas Petri que contenían agar Mc Conkey (selectivo para bacterias Gram negativas y anaerobias facultativas) para luego ser incubadas a 37°C por 24 h. Posteriormente se eligió una colonia de cada placa que fuese lactosa positiva la cual fue expuesta a diferentes pruebas bioquímicas (Cuadro 1) para la identificación de *Escherichia coli*; luego de la confirmación del diagnóstico de dicho microorganismo, se colocaron en agar tripticasa de soya para su mantenimiento hasta su remisión y procesamiento de serotipificación respectivo.

Cuadro 1. Pruebas Bioquímicas utilizadas para la identificación de *Escherichia coli*

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	Reacción	
	Positivo	Negativo
Sulfidriilo		+
Indol	+	

Movimiento	+	
Malonato		+
Úrea		+
Citrato de Simons		+
Lisina	+	
Ornitina	+	
Glucosa	+	
Lactosa	+	
Gluconato		+
Rojo de metilo	+	
Fenilalanina	+	
Voges Proskauer		+

3.2.4 Preparación y obtención de antígenos somáticos

Cada una de las cepas aisladas, se sembró nuevamente en agar tripticasa de soya (TSA) y se colocaron a 37°C por 24 horas, pasado el tiempo se añadió solución salina hasta el pico de flauta de cada tubo. Se removió despacio para que las colonias se desprendan mas no el agar, luego se colocó el líquido en otro tubo de ensayo previamente rotulado con el número de muestra para luego esterilizarlo a 110°C por 1 hora. Finalmente, se dejó enfriar y se agregó formalina.

3.2.5 Preparación y obtención de antígenos flagelares

Se preparó el medio semisólido en tubos de TSA (MERCK) según la cantidad de cepas, a estos se le introdujo un tubo delgado llamado tubo de Durham con el fin de impulsar el movimiento de la bacteria para que de esta manera se exprese mejor el antígeno flagelar. Con un ansa pequeña se inocularon las cepas dentro de los tubos de Durham y se incubaron a 37°C por 2 semanas aproximadamente. Pasando estas semanas se observó la turbidez fuera de los tubos de Durham en los medios semisólidos, siendo esto indicativo que ha habido movimiento flagelar, como algunas cepas son inmóviles la turbidez se observó dentro del tubo de Durham dándole la denominación H- a la cepa.

5.2.6 Procedimiento de Serotipificación (UNAM, 2012)

Procedimiento para antígenos somáticos

Primera fase: Se pipeteó con ayuda de un auxiliar automático, volúmenes de 50ul de los antisueros somáticos: O1 hasta O187 (194 antisueros) sobre placas de ELISA fondo rojo. Se añadió sobre estos pocillos los antisueros descritos y los antígenos somáticos preparados anteriormente. La incubación se dio a una temperatura de 50°C por 24 horas. La lectura se llevó a cabo de acuerdo a la mayor o menor aglutinación antígeno-anticuerpo el cual se observó por la formación de un precipitado en forma de botón (negativo) o lámina (+, ++, +++, ++++),. Los antígenos positivos pasaron a una segunda fase.

Segunda fase: Se buscó precisar el diagnóstico de los antígenos somáticos identificados en la primera fase. Para ello, se realizaron titilaciones de los antisueros desde 1:100 hasta 1: 12800, en solución salina al 0.85% en la placa de ELISA. Se colocaron 100ul de antisuero a ser estudiado por columna (cada columna un antisuero de interés), desde el A1 hasta el A12. Posteriormente, se colocaron 50 ul de suero fisiológico en cada pocillo, desde el B1 hasta el B12; así sucesivamente las filas C, D, E, F, G y H. Las diluciones requeridas al principio de esta etapa se consiguieron a través de pasajes sucesivos con el respectivo homogenizado, de 50ul de suero desde la fila A hacia la B, de la B a la C, así sucesivamente hasta culminar en la fila H, eliminando finalmente lo último para que todos los pocillos tengan contenidos 50ul de volumen. Se añadió 50ul de antígeno preparado por columna en toda la placa a en los pocillos donde se observó reacción. Se incubó a 50°C por 18 a 24 horas. Para realizar la lectura se observaron las reacciones antígeno – anticuerpo las cuales van desde negativo por la formación de un precipitado en forma de botón hasta 4+ por la presencia de una lámina estrellada en todo el pocillo. Los antígenos positivos pasaron a una tercera fase.

Tercera fase: Se buscó precisar el diagnóstico de los antígenos somáticos identificados en la segunda fase. Para ello, se realizaron titilaciones de los antisueros desde 1:50 hasta 1:6400, en solución salina al 0.85% en la placa de ELISA, se utilizaron antisueros puros que poseían un título de 1:10 (homólogo). Se colocó 80ul de solución fisiológica desde el A1 hasta el A12 luego 50ul de suero fisiológico en cada pocillo, desde el B1 hasta el B12; así sucesivamente las filas C, D, E, F, G y H. Se añadieron 20 ul de suero puro a toda la fila A, para la dilución 1:50, y a partir de ahí, se pasaron 50ul de la solución hacia las filas B, C, D, E, F, G y H, para conseguir las diluciones como está descrito al principio de esta etapa eliminando finalmente lo último

para que finalmente todos los pocillos tengan contenidos 50ul de volumen. Se añadieron 50ul de antígeno preparado por columna en toda la placa según corresponda y requiera la evaluación. Se envió a incubar a 50°C por 24 horas. La lectura se llevó a cabo de acuerdo a la mayor o menor posibilidad de aglutinación antígeno-anticuerpo (antisuero de grupo) donde la formación de un botón o una lámina serán los posibles resultados a leer. El título aglutinante se determinó de acuerdo a la capacidad que tuvo, conforme se dió mayor dilución. Se Realizó la identificación de las placas y su respectiva dilución de los antisueros de los antígenos somáticos, a ser verificados según formato.

Procedimiento para antígenos flagelares

Las 3 fases para la serotipificación anteriormente descritas son similares para ambas clases de antígenos, con la diferencia que en caso de los antígenos flagelares la incubación se dió por dos horas para cada fase. El resultado final fue obtenido en el serotipado somático junto con el flagelar.

VI. RESULTADOS

Se evaluaron las heces de 150 animales cuyo criterio de inclusión fue la presentación de un cuadro diarreico, de los cuales se logró aislar *E. coli* del 78% (117/150) de las muestras evaluadas. Posteriormente se realizó la serotipificación por aglutinación identificándose 39 serogrupos diferentes; los serogrupos con mayor frecuencia fueron el O8 (9.4%), ONT (8.55%), O118 (7.69%) y O24 (7.69%) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Frecuencia de serogrupos aislados a partir de muestras de crías de alpaca con diarrea (n=117)

SEROGRUPO	ANTÍGENOS FLAGELARES	CANTIDAD	FRECUENCIA %
O8	H10(1), H49(3), H18(1), H19(2), H40(1), H11(1), H?/H-(2)	11	9.40
ONT*	H10(1), H2(1), H11(1), H40(1), H1(1), H12(1), H?/H-(4)	10	8.55
O118	H21 (9)	9	7.69
O24	H18(8),H8(1)	9	7.69
O74	H39(8)	8	6.84
OR**	H18(1), H8(2),H25(2), H7(1); H?/H-(1)	7	5.98
O145	H39(1), H25(1), H6(2)	4	3.42
O103	H39(1), H21(2), H?/H-(1)	4	3.42
O78	H7(1), H21(1), H?/H-(2)	4	3.42
O7	H8(2), H6(1), H?/H-(1)	4	3.42
O110	H7(1), H28(2)	3	2.56
O4	H16(2), H?/H-(1)	3	2.56
O153	H4(2), H?/H-(1)	3	2.56
O150	H8(3)	3	2.56
O79	H40(3)	3	2.56
O20	O145:H45(1),H55(1)	2	1.71
O102	H21(2)	2	1.71
O93	H39(1), H?/H-(1)	2	1.71
O109	H11(2)	2	1.71
O2	H12(1), H6(1)	2	1.71
O105ab	H4(1), H?/H-(1)	2	1.71
O85	H4(2)	2	1.71
O56	H18(2)	2	1.71
O9	H10(1)	1	0.85
O39	H7(1)	1	0.85
O32	H10(1)	1	0.85
O101	H4(1)	1	0.85
O177	H11(1)	1	0.85
O81	H7(1)	1	0.85
O73	H12(1)	1	0.85
O116	H8(1)	1	0.85
O139	H8(1)	1	0.85
O70	H11(1)	1	0.85
O108	H21(1)	1	0.85
O16	H28(1)	1	0.85
O184	H21(1)	1	0.85
O170	H49(1)	1	0.85
O88	H?/H-(1)	1	0.85
O6	H?/H-(1)	1	0.85
TOTAL		117	100

***Antígeno somático No Tipificable**

****Antígeno rugoso;** aquel que posee gran cantidad de reacciones cruzadas.

En cuanto a los serotipos, se hallaron 71 serotipos diferentes que corresponden al 60.68% del total de muestras serotipificadas, siendo los serotipos

O118:H21 (7.69%), O24:H18 (6.84%) y O74:H39 (6.84%) los que se presentaron con mayor frecuencia (Cuadro 3).

Cuadro 3. Frecuencia de serotipos aislados e identificados a partir de muestras de crías de alpaca con diarrea. (n=71)

SEROTIPO	CANTIDA	FRECUENCIA	SEROTIPO	CANTI	FRECUENCIA
O118:H21 [©]	9	7.69	O24:H8 [©]	1	0.85
O24:H18 [©]	8	6.84	O32:H10 [©]	1	0.85
O74:H39 *	8	6.84	O39:H7 [©]	1	0.85
ONT:H- *	4	3.42	O70:H11*	1	0.85
O8:H49 [©]	3	2.56	O73:H12 [©]	1	0.85
O79:H40 [€]	3	2.56	O78:H7 [©]	1	0.85
O150:H8 *	3	2.56	O78:H21 *	1	0.85
O4:H16 [©]	2	1.71	O81:H7 [©]	1	0.85
O7:H8 [©]	2	1.71	O88:H- *	1	0.85
O8:H19 *	2	1.71	O93:H39 [©]	1	0.85
O8:H- *	2	1.71	O93:H- **	1	0.85
O56:H18 [©]	2	1.71	O101:H4 [©]	1	0.85
O78:H- [©]	2	1.71	O103:H39 [©]	1	0.85
O85:H4 [©]	2	1.71	O103:H- [©]	1	0.85
O102:H21 *	2	1.71	O145ab:H4	1	0.85
O103:H21 *	2	1.71	O105ab:H- [©]	1	0.85
O109:H11 [€]	2	1.71	O108:H21 [©]	1	0.85
O110:H28 *	2	1.71	O110:H7 [©]	1	0.85
O145:H6 **	2	1.71	O116:H8 [©]	1	0.85
O153:H4 [©]	2	1.71	O139:H8 *	1	0.85
OR:H8 *	2	1.71	O145:H25 *	1	0.85
OR:H25 [©]	2	1.71	O145:H39 [©]	1	0.85
O2:H6*	1	0.85	O153:H-*	1	0.85
O2:H12+	1	0.85	O170:H49**	1	0.85
O4:H- [©]	1	0.85	O177:H11*	1	0.85
O6:H- [©]	1	0.85	O184:H21 [€]	1	0.85
O7:H6 ++	1	0.85	ONT:H1 [©]	1	0.85
O7:H- [©]	1	0.85	ONT:H2 *	1	0.85
O8:H10 [©]	1	0.85	ONT:H10***	1	0.85
O8:H11 [©]	1	0.85	ONT:H11 *	1	0.85
O8:H18 [©]	1	0.85	ONT:H12 [©]	1	0.85
O8:H40 [©]	1	0.85	ONT:H40 [©]	1	0.85
O9:H10 [©]	1	0.85	OR:H7 *	1	0.85
O16:H28 [©]	1	0.85	OR:H18 [©]	1	0.85
O20:O145H45 [©]	1	0.85	OR:H- *	1	0.85
O20:H55 [©]	1	0.85			

* Cepas reportadas como STEC

** Cepas reportadas como EPEC

*** Cepas reportadas como EAEC

+ Relacionada a nuevo grupo patógeno

++Cepa reportada como comensal, no patógeno

€ Sin relación con algún patotipo

©Sin reporte anterior

V. DISCUSIÓN

En la actualidad existen escasos estudios sobre la serotipificación de *E. coli* en animales (Orskov y Orskov, 1976; Wieler *et al.*, 2000; Hussein, 2006; Aidar – Ugrinovich *et al.* 2007; Fernández *et al.*, 2010), y aún menos en camélidos sudamericanos (Mercado *et al.*, 2004; Silvera *et al.*, 2012), siendo los patotipos de *E. coli* reportados en alpacas: STEC y/o EHEC y EPEC (Ramírez y Ellis, 1988; Luna *et al.*, 2012). En el presente estudio, de los 71 serotipos diferentes encontrados que corresponde al 60.68% del total de muestras evaluadas, el 29.58% (21/71) han sido reportadas y relacionadas con cepas STEC, como lo encontrado en la investigación por Silvera *et al.* (2012), además uno de los serotipos, el O2:H12, si bien tiene una frecuencia de 0.85% (cuadro 3) ha sido reportado como perteneciente a una posible nueva categoría de las *E. coli* diarreogénicas (Hinenoya *et al.*, 2007) pues es Cdt – positivo (Cytolethal distending toxin) (Hinenoya *et al.*, 2007; Tóth *et al.*, 2009) la cual es una toxina que induce a la disminución de la actividad celular, por ende, a la muerte de las mismas células (Tóth *et al.*, 2009), la importancia radica en que este serotipo ha sido reportado en una muestra de heces diarreicas en un niño japonés y se conoce que causa daños a nivel intestinal en ratones afectados (Hinenoya *et al.*, 2007), de la misma manera el serotipo ONT:H10 (cuadro 3) es mencionado como EAEC causante de brotes por consumo de semillas o vegetales en la revisión bibliográfica de Blanco (2012), en la

cual se presta especial atención a un brote ocurrido en el año 2011. El serotipo O184:H21 se ha aislado en aguas residuales tratadas para eliminar contaminantes lo que tiene conexión con la actividad agrícola para la generación de los productos de origen vegetal que sumaría al riesgo de presentación de enfermedades tanto en salud pública y animal (Dumontet *et al.*, 2011).

Por otro lado, entre los serogrupos más prevalentes tenemos al O8, ONT, O118 y O24 con 9.4%, 8.55%, 7.69% y 7.69% respectivamente (cuadro 3), y entre los serotipos más prevalentes tenemos al O118:H21, O24:H18 y O74:H39 con 7.69%, 6.84% y 6.84%, respectivamente (cuadro 3). El serogrupo O8 se asocia con patologías en porcinos como la enfermedad de los edemas (Sheutz y Strockbine, 2005); se hallaron cepas pertenecientes este serogrupo como al O78 asociados a diarreas de neonatos de alpacas (SENASA, 2011), el ONT es el antígeno somático no tipificado que puede pertenecer a cualquier patotipo diarreogénico según la bibliografía revisada para la presente investigación, como lo reporta Constantiniu (2002); Rodríguez – Ángeles (2002); Rivero *et al.* (2004); Timm *et al.* (2007); Döpfer *et al.* (2010); Fernández *et al.* (2010); Bosilevac y Kooh (2011); Blanco (2012). El O118 se encuentra ligado a cepas productoras de toxina Shiga (Torres, 2010); lo que es confirmado en el estudio de Wieler *et al.* (2000) donde se compararon cepas aisladas de 29 personas provenientes de Europa, Canadá y Perú, con cepas aisladas de 7 bovinos procedentes de Bavaria y un niño infectado con el serotipo O118:H16. Por su parte el serogrupo O24 carece de reportes hasta el momento; así mismo, los serogrupos O7, O20, O56, O73, O78 y O103 (cuadro 2) se hallaron en un estudio realizado en Egipto aislados de heces diarreicas de niños (Peruski *et al.*, 1999); en este estudio se han encontrado serotipos con estos antígenos somáticos sin embargo carecen de reportes como serotipos en sí; lo mismo sucede con los serogrupos O145 y O4 relacionados a EHEC y serotipos O6 y O153 asociados a ETEC (Margall *et al.*, 1997).

Respecto a los serotipos más frecuentes en este estudio el O74:H39 es el único reportado en la literatura, fue aislado a partir de hisopados rectales de vacas lecheras de 5 establos en Argentina, se hallaron este y otros serotipos relacionados a cepas STEC, este serotipo al igual que la O157:H7 posee la toxina Stx2, el gen eae y es incapaz de fermentar sorbitol por lo podría estar relacionado con el SUH y colitis gangrenosa (Fernández *et al.*, 2010). Los otros dos serotipos frecuentes O118:H21 (7.69%) y O24:H18 (6.84%), carecen de notificación en investigaciones anteriormente realizadas y

se infiere que es la primera vez que son identificadas en un estudio relacionados a cuadros clínicos.

Los serotipos O93:H- y O170:H49 (cuadro 3) son reportados como cepas de EPEC en la literatura, el primero corresponde a una EPEC atípica que se encuentra relacionado a dos genes (*iha*, *paa*) pertenecientes a las cepas productoras de toxina Shiga (Gomez *et al.*, 2011) y el O170:H49 también pertenece a las EPEC atípicas y fue reportado en el estudio de Tennant *et al.* (2009) el cual consistió en la evaluación filogenética de 75 cepas pertenecientes a ese mismo grupo comparándolas con cepas de referencia de EPEC típicas y STEC para tener conocimiento si pertenecen a alguno de estos dos grupos, el estudio reveló que 61 de las cepas evaluadas no pertenecen a ninguno de los dos grupos patógenos.

Entre otros reportes de serotipos hallados en la presente investigación tenemos al ONT: H- que ha sido aislado a partir de muestras diarreicas de humanos (Constantiniu; 2002) por lo que es interesante saber que se ha aislado en muestras de crías de alpacas; el serotipo O79:H40 fue utilizado en el estudio de Beutin y Strauch (2007), pues el antígeno H40 y H8 se caracterizan por presentar reacciones cruzadas, este último se encuentra relacionado a cepas STEC, resultando que los serotipos con antígeno flagelar H40 no poseían los factores de virulencia de una STEC.

El O150:H11 ha sido aislado de ganado vacuno y a pesar de haber sido identificado como STEC no es perjudicial para el ser humano por no presentar los factores de virulencia claves para la presentación de la enfermedad tales como Stx1 y Stx2 (Hussein, 2006), el O110:H28 fue uno de los serotipos aislado de ovinos como potencial patógeno en seres humanos por la transferencia genética horizontal (Döpfer *et al.*, 2010). El O8:H19, pertenece a los STEC y se ha aislado a partir de carne picada, quesos de pasta blanda, hamburguesas y otros productos derivados de bovinos (Rivero *et al.*, 2004), en el 2013 un niño de 9 años procedente de los países bajos padeció de sintomatología clínica relacionada con SUH detectándose este serotipo (Friesema *et al.*, 2015).

El serotipo O145:H25 fue identificado en cuadros diarreicos y de SUH en otro estudio que caracterizaba genotípica y fenotípicamente al serogrupo O145 (Sonntag *et al.*, 2004); el O177:H11 se aisló en muestras fecales de terneros provenientes de granjas

de São Paulo – Brazil los que podrían estar implicados en severas infecciones en humanos en dicha ciudad (Aidar – Ugrinovich *et al.*, 2007; Timm *et al.*, 2007).

Algunos serotipos que se reportan en el presente estudio han sido aislados únicamente de animales: O139:H8, O153:H-, OR:H7, OR:H8, ONT:H2 (Constantiniu, 2002) y O102:H21 (Pradel *et al.*, 2015), no obstante es de suma importancia prestar atención a las cepas identificadas pues como se ha mencionado los serotipos STEC y EHEC son los principales causantes del SUH en humanos (Jarvis y Kaper, 1996; Rodríguez – Ángeles, 2002; Rivero *et al.*, 2004; Lara - Ochoa *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2011; OMS, 2011; Jandhyala *et al.*, 2013), además pueden afectar la salud de mamíferos y aves (Nataro y Kaper, 1998; Rodríguez – Ángeles, 2002; Sheutz y Strockbine, 2005; Ahmad *et al.*, 2011); cabe resaltar que existen serotipos que pueden afectar tanto al tracto gastrointestinal como al urinario (Kaper *et al.*, 2004; Puerta – García y Mateos – Rodríguez, 2010) los cuales toman el nombre de heteropatogénicos tal es el caso del mencionado O2:H6 (cuadro 3) el cual ha sido el primer híbrido en ser identificado de esta bacteria (Bielaszewska *et al.*, 2014), como también existen serotipos que no son patógenos tal es el caso del O7:H6, con frecuencia de 0.85% en el presente estudio (cuadro 3), según Peeters *et al.* (1984) lo aislaron de conejos destetados sanos utilizados en su investigación sobre la patogenicidad de cepas que ocasionan enfacelamiento en células intestinales, el efecto de este serotipo fue nulo pues no causó ningún signo clínico ni lesión en los enterocitos.

Entre los serotipos más estudiados y que provoca cuadros clínicos de SUH y colitis gangrenosa se encuentra la O157:H7 el cual aún no se ha notificado en esta especie animal a pesar del estudio realizado por Silvera *et al.* (2012) donde se hallaron serotipos compatibles con cepas STEC por poseer el gen *eae* y la toxina Stx2, la cual está relacionada mayormente con el SUH, en comparación con la Stx1 (Torres, 2010), así mismo el O26:H11 es un serotipo EPEC (Zhang *et al.*, 2000; Rodríguez – Ángeles, 2002) que por transmisión genética horizontal posee los genes que codifican a la toxina Shiga produciendo también dichas patologías (Lawrence y Ochman, 1998; Döpfer *et al.*, 2010), H11 ha sido identificado en guanacos y bovinos, por Mercado *et al.* (2004) y Aidar – Ugrinovich *et al.* (2007) respectivamente. No obstante, en la presente investigación no se ha obtenido ninguna cepa compatible con estos serotipos pero sí las mencionadas STEC que también pueden asumir un rol de riesgo en salud pública y animal, cabe resaltar que los bovinos, ovinos y porcinos son reservorios naturales de

cepas O157:H7 y pueden diseminar el serotipo a través de las heces así infectando individuos que puedan entrar en contacto con las mismas (Rivero *et al.*, 2004; Hussein, 2006; Aidar – Ugrinovich *et al.*, 2007; Döpfer *et al.*, 2010; Lara – Ochoa *et al.*, 2010; Manning, 2010; Madigan *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2011; Friesema *et al.* 2015).

Por otro lado, el 57.75% (41/71) (cuadro 3) de los serotipos encontrados no se han podido identificar o relacionar con alguna cepa patógena o no han sido reportados en estudios a pesar que algunos serogrupos como O2, O8, O56, O78, O156, entre otros han sido vinculados con los diferentes patotipos.

Por último, en el presente trabajo se utilizó la técnica de serotipificación a través de la aglutinación en placa (serotipificación clásica) para poder obtener todos los serotipos posibles de la *Escherichia coli* en diarrea de neonatos de alpacas, a pesar que existen varios reportes de Fields *et al.* (1997), Zhang *et al.* (2000), Ramos *et al.* (2006) y Badri *et al.* (2010) quienes indican que el método de PCR – RFLP es más completo para hallar el antígeno flagelar pues algunas veces este no se expresa y se opta por colocar la nomenclatura H?/H-, es más costoso por lo cual se utilizó la serotipificación clásica.

VI. CONCLUSIONES

Existen 71 diferentes serotipos implicados en cuadros diarreicos de crías de alpacas en Cerro de Pasco.

Los serotipos O118:H21 y O24:H18 se han identificado con frecuencias de 7.69% y 6.84% respectivamente; sin embargo como no se han hallado reportes de los mismos, esta sería la primera vez que se están notificando a partir de una investigación.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Agin T, Wolf M. 1997. Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching-effacing lesions in rabbits, humans, and swine. *Infection and Immunity* 65(1): 320 – 326
- 2 Ahmad N, Drew W, Plorde J. 2011. Sherris microbiología médica. 5^{ta} ed. México: Mc Graw Hill, 793p.
- 3 Aidar – Ugrinovich L, Blanco J, Blanco J. E, Leomil L, Dahbi G, Mora A, Onuma D, Silveira W, Pesatana de Castro A. 2007. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. *International Journal of Food Microbiology* 115: 297 – 306
- 4 Alexa P, Stouracova K, Hamrik J, Rychlik I. 2001. Gene typing of the colonization factors K88 (F4) in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic piglets. *Vet. Med. – Czech.* 46 (2): 46 – 49
- 5 Alteri C, Mobley H. 2012. *Escherichia coli* physiology and metabolism dictates adaptation to diverse host microenvironments. USA. 9 p
- 6 Ameghino E, DeMartini J. 1991. Mortalidad en alpacas. Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura: 81 – 86
- 7 Badri S, Fassouane A, Filliol I, Hassar M, Cohen N. 2010. Sequence analysis of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* isolated from food in Morocco. *Journal of Microbiology* 48 (2): 184 – 187

- 8 Bakás L, Maté S, Vazquez R, Herlax V. 2013. Mecanismo de acción de la toxina alfa hemolisina de *Escherichia coli*. *Bioquímica Clínica Latinoamericana* 47(2): 353 – 361.
- 9 Bakker D, Willensen P, Willems R, Huisman T, Mooi F, Oudega B, Stegehuis F, Graaf F. 1996. Identification of minor fimbrial subunits involved in biosynthesis of K88 fimbriae. *Journal of Bacteriology* 174 (20): 6350 – 6358
- 10 Benfield D, Francis D, McAdaraugh J, Jhonson D, Bergeland M, Rossow K, Moore R. 1988. Combined rotavirus and K99 *Escherichia coli* infection in gnotobiotic pigs. *American Journal of Veterinary Research* 49(3): 330 – 337
- 11 Benz R, Schmid, A, Wagner W, Goebel W. 1989. Pore formation by the *Escherichia coli* hemolysin: evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates. *Infect Immun* 57: 887 – 895
- 12 Beutin L, Strauch E. 2007. Identification of sequence diversity in the *Escherichia coli* Flic genes encoding flagellar types h8 and h40 and its use in typing of shiga toxin-producing *E. coli* O8, O22, O111, O174, and O179 strains. *Journal of clinical microbiology* 45(2): 333 – 339
- 13 Bhatia R, Ichhpujani R 2008. *Essentials of medical microbiology*. 4^{ta} ed. India: Japee Brothers Medical Publishers, 517p
- 14 Bielaszewska M, Schiller R, Lammers L, Bauwens A, Fruth A, Middendorf B, Schimidt M, Tarr P, Bobrindt U, Karch H, Mellman A. 2014. Heteropathogenic virulence and phylogeny reveal phased pathogenic metamorphosis in *Escherichia coli* O2:H6. *EMBO Molecular Medicine* 6(3): 437 – 358
- 15 Blanco J. 2012. *Escherichia coli* enteroagregativa O104:H4-ST678 productora de Stx2a. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 30(2):84 – 89
- 16 Bosilevac J, Koohmaraie M. 2011. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* isolates from commercial ground beef in the United States. *Applied and Environmental Microbiology* 77(6): 2103 – 2112
- 17 Brinton, C. 1965. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria. *Trans. N.Y. Acad. Sci. Sec. II* 27:1003-1054.
- 18 Brooks G, Carrol K, Butel J, Morse S, Mietzner T. 2013. Jawetz, Melnick & Adelberg's *Medical Microbiology*. 26^{ava} ed. USA: Mc Graw Hill, 879 p.
- 19 Caffer M, Terragno R. 2001. *Manual de procedimientos para la identificación de Salmonella* – Argentina: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas – 37 p

- 20 Calle S, Morales S, Mori L. 2010. Manual de bacteriología y micología. Universidad Mayor de San Marcos: 147p
- 21 Casadevall A, Pirofski L. 2009. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage –response framework. *Journal of Water and Health* 7(51): 2 – 18
- 22 Caugant D, Levin B, Orskov I, Orskov F, Svanborg C, Selander R. 1985. Genetic Diversity in Relation to Serotype in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 49 (2): 407 – 413
- 23 Castaño L, Bilbao J. 1997. Introducción a la biología molecula y aplicación a la pediatría (4): Estudio de mutaciones en AND amplificado por PCR. *An Esp Pediatr* 46: 305 – 310.
- 24 Cavalieri, S.J., Bohach, G.A., Snyder, I.S. 1984. *Escherichia coli* alpha hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol Rev*; 48: 326- 343
- 25 Constantiniu S. 2002. *Escherichia coli* enterohemoragic – an emerged pathogen of human infections part II. Non-o157 *Escherichia coli* enterohemorrhagic. *The journal of preventive medicine* 10 (4): 57 – 73
- 26 Cowart R, Foster B. 1985. Differential effects of iron on the growth of *Listenia monocytogenes*: minimum requirements and mechanism of acquisition. *J. Infect. Dis.* 151:721-730.
- 27 Danese P, Pratt L, Kolter R. 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol* 182: 3593– 3596
- 28 Daniels C, Vindurampulle C, Morona R. 1998. Overexpression and topology of the *Shigella flexneri* O-antigen polymerase (Rfc/Wzy). *Molecular Microbiology* 28(6): 1211 – 1222
- 29 DebRoy C, Roberts E, Fratamico M. 2011. Detection of O antigens in *Escherichia coli*. *Animal Health Research Reviews* 9 (2): 169 – 185.
- 30 Dodgson C. Amor P, Whitfield C. 1996. Distribution of the *rol* gene encoding the regulator of lipopolysaccharide O-chain length in *Escherichia coli* and its influence on the expression of group I capsular K antigens. *Journal of Bacteriology* 178 (6): 1895–1902
- 31 Döpfer D, Sekse C, Beutin L, Solheim H, Van der Wal F, Slettemeas J, Wasteson Y, Urdahl A. 2010. Pathogenic potential and horizontal gene transfer in ovine

- gastrointestinal *Escherichia coli*. Journal of Applied Microbiology 108: 1552 – 1562
- 32 Donenberg M. 2013. *Escherichia coli*: pathotypes and principles of pathogenesis. 2^{da} ed. Baltimore: ElSiever, 571p
 - 33 Dumontet S, Scopa A, Kerje S, Krovacek K. The importance of pathogenic organism in sewage and sewage sludge. J. Air & Waste Manage. Assoc. 51: 848 – 860
 - 34 Fernández D, Irino A, Sanz M, Padola N, Parma A. 2010. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from dairy cows in Argentina. The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology 51: 377 – 382
 - 35 Fields P, Blom K, Hughes J, Helsel L, Feng P, Swaminathan B. 1997. Molecular characterization of the gene encoding h antigen in *Escherichia coli* and development of a PCR - restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM. Journal of Clinical Microbiology 35 (5): 1066 – 1070
 - 36 Figueroa I, Verdugo A. 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. Rev Lat de Microb 47 (1 – 2): 25 – 42
 - 37 Foster A, Otter A, Barlow A, Pearson G, Woodward M, Higgins R. 2008. Naturally occurring intestinal lesions in three alpacas (*Vicugna pacos*) caused by attaching and effacing *Escherichia coli*. Veterinary Record 162: 318 – 320
 - 38 Friesema I, Keijzer-Veen M, Koppejan M, Schipper H, Griethuysen A, Heck M, Pelt W. 2015. Hemolytic uremic syndrome associated with *Escherichia coli* O8:H19 and shiga toxin 2f gene. Emerging infections disease 21(1): 168 – 169
 - 39 García J. 2000. La alfa hemolisina de *Escherichia coli* induce aumentos en el calcio citoplásmico de neutrófilos y monocitos humanos. Rev costarric cienc méd 21(1 – 2):
 - 40 Garegg P, Lindberg B, Onn T, Sutherland I. 1971. Comparative structure studies on the M-antigen from *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Aerobacter cloacae*. Acta Chem. Scand. 25: 2103 – 2108
 - 41 Garrity G, Bell J, Lilburn, T. 2004. Taxonomic Outline of the Procaryotes. 2^{da} Edición. Bergey's manual of systematic bacteriology. New York: 114 p
 - 42 Gicquelais K, Baldini M, Martinez J, Maggi L, Martin W, Prado V, Kaper J, Levine M. 1990. Practical and economical method for using biotinylated DNA probes with

- bacterial colony blots to identify diarrhea-causing *Escherichia coli*. J. Clin Microbiology 28(11): 2485 – 90.
- 43 Golenbock D, Hampton R, Qureshi N, Takayama k, Raetz C. 199. Lipis A – like molecules that antagonize the effects of endotoxins on Human monocytes. Journal of Biology Chemistry 266 (29): 19490 – 19498.
 - 44 Gómez T, Hernandez R, Torres A, Salvador F, Guth B, Vaz T, Irino K, Silva R,Vieira M. 2011. Adhesin - encoding genes from Shiga toxin - producing *Escherichia coli*. Journal of clinical microbiology 49 (9): 3334 – 3337
 - 45 Are More Prevalent in Atypical than in Typical Enteropathogenic E. coli
 - 46 Hanley J, Salit I, Hofman T. 1985. Immunochemical characterization of P pili from invasive *Escherichia coli*. Infection and Immunity 49(3): 581 – 586
 - 47 Harel J, Lapointe H, Fallara A, Lortie I, Bigras-poulin M, Lariviere M, Fairbrother J. 1991. Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. Journal of Clinical Microbiology 29 (4): 745 – 752
 - 48 Hinenoya A, Nagita A, Asakura M, Tsukamoto T, Ramamurthy T, Nair G, Takeda Y, Yamasaki S. 2007. Cytolethal distending toxin (cdt)-producing *Escherichia coli* isolated from a child with bloody diarrhea in Japan. Microbiol. Immunol 51(4): 435 – 438
 - 49 Hussein H. 2006. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin – producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. Journal of animal science 82: 63 – 72.
 - 50 [IVITA] Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura. 1987. Enfermedades infecciosas y parasitarias de las alpacas. Revista de camélidos sudamericanos 4: 18 – 19
 - 51 [IVITA] Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura. 1988. Colibacilosis. Revista de camélidos sudamericanos 6: 14 – 17
 - 52 [IVITA] Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura. 1990. Colibacilosis entérica en crías de alpacas. Avances sobre investigación en salud animal, camélidos sudamericanos 23: 20 – 24
 - 53 Jandhyala D, Vanguri V, Boll E, Lai Y, McCormick B, Leong J. 2013. Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* O104:H4. Infect Dis Clin N Am 27: 631 – 649

- 54 Jarvis K, Kaper J. 1996. Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infection and Immunity* 64 (11): 4826 – 4829
- 55 Johnson T, Nolan L. 2009. Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73(4): 750 – 774
- 56 Kaper J, Nataro J, Mobley H. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2: 123 – 240.
- 57 Kauffmann F, Orskov F, Ewing W. 1956. Designations for the k antigens of *Escherichia coli* serotypes. *International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy* 6 (2): 63 – 64.
- 58 Kim B, Kang J, Kim K. 2005. Invasion processes of pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology* 295: 463 – 470
- 59 Konhauser K, Kappler A, Roden E. 2011. Iron in microbial metabolism. *Elements* 7: 89 – 93.
- 60 Lan R, Reeves P. 2002. *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of *Shigella*. *El Siever*. 1125 – 1132
- 61 Lara – Ochoa C, Oropeza R, Huerta – Sauquero A. 2010. Regulation of the LEE - Pathogenicity Island in attaching and effacing bacteria. Cuernavaca. 11 p
- 62 Lawrence J, Ochman H. 1998. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 9413 – 9417
- 63 Lingwood C, Law H, Richardson S, Petric M, Brunton J, De Grandis S, Karmali M. 1987. Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 262(18): , 8834-8839
- 64 Litwin C, Calderwood S. 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* 6(2), 137–149
- 65 Louisiana Dept of Health & Hospitals. 2009. *Escherichia coli* (*E.coli*) infections. Louisiana: 1 – 10
- 66 Luna L, Maturrano L, Rivera H, Zanabria V, Rosadio R. 2012. Genotipificación, evaluación toxigénica in vitro y sensibilidad a antibióticos de cepas de *Escherichia coli* aisladas de casos diarreicos y fatales en alpacas neonatas. *Rev Inv Vet, Perú* 23: 280 – 288.
- 67 Madigan M, Martinko J, Stahl D, Clark D. 2010. Brock biology of microorganism. 13th ed. San Francisco: Pearson Education Inc. 1155p

- 68 Manning S. 2010. *Escherichia coli* infections. 2^{da} Edición. Washington: Hilary Babcock, M.D., M.P.H. 135p
- 69 Margall N, Domínguez A, Prats G, Salleras L. 1997. *Escherichia coli* enterohemorrágica. Rev Esp Salud Pública 71(5): 437 – 443
- 70 McGrath B, Osborn M. 1991. Localization of the terminal steps of O antigen synthesis in *Salmonella Typhimurium*. Journal of Bacteriology 173 (2): 649 – 654.
- 71 Mead P, Slutsker L, Dietz V, McCaig L, Bresee J, Shapiro C, Griffin P, Tauxe R. 1999. Food – Related illness and death in the United States. Emerging Infectious Diseases 5 (5): 607 – 625.
- 72 Mercado E, Rodriguez S, Elizondo A, Marcoppido G, Parreño V. 2004. Isolation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from a South American Camelid (*Lama guanicoe*) with Diarrhea. J Clin Microbiol 42(10): 4809 – 4811
- 73 Mol O, Oudega B. 1992. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Reviews 19: 25 – 52
- 74 Morales S, Paredes D, Pezo D. 2007. Asociación de rotavirus y *Escherichia coli* fimbriada como agentes causales de infecciones entéricas en alpacas neonatas. Rev Inv Vet Perú 18 (2): 150 – 153
- 75 Moro, M. 1965. Enfermedades infecciosas de las alpacas y ovinos observadas en el Perú. Boletín de divulgación N° 4: 12 – 13
- 76 Mulford C, Osborn M. 1983. An intermediate step in translocation of lipopolysaccharide to outer membrane of *Salmonella Typhimurium*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80: 1159–1163.
- 77 Mundy R, McDonald T, Dougan G, Frankel G, Wiles S. 2005. *Citrobacter rodentium* of mice and man. Cellular Microbiology 7(12): 1697 – 1706
- 78 Muniesa M, Hammerl J, Hertwig S, Appel B, Brüssow H. 2012. Shiga toxin producing *Escherichia coli* O104:H4: a new challenge for microbiology. Applied and Environmental Microbiology 78(12): 4065 – 4073
- 79 Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. 2014. Microbiología Médica. 7^{ma} ed. Barcelona: El Sevier, 984p
- 80 Nataro J y Nataro K. 1998. Diarreagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews 11(1): 142 – 201.
- 81 Odonkor S, Ampofo J. 2013. *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. Microbiology Research 4 (2): 5 – 11

- 82 [OMS] Organización Mundial de la Salud. 2011. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Nota descriptiva N°125. [Internet] [23 de octubre del 2014]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>
- 83 Orskov F, Orskov I. 1975. *Escherichia coli* O:H serotypes isolated from human blood. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B, 83: 595 – 600
- 84 Orskov I, Orskov F. 1976. Five new *Escherichia coli* K antigens, K95, K96, K97, K98 and K100. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 84: 321 - 325.
- 85 Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K. 1977. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. Bacteriological Reviews 41(3): 667 – 710
- 86 Palacios C, Perales R, Chavera A, López T. 2005. Caracterización anátomo – histopatológica de enteropatías causantes de mortalidad de crías de alpacas. Rev Inv Vet Perú 16(1): 34 – 40
- 87 Parija S. 2012. Textbook of microbiology & immunology. 2^{da} ed. Nueva Delhi: El Siever, 684p
- 88 Pavia de Sousa C. 2006. *Escherichia coli* as a specialized bacterial pathogen. Revista de Biología e Ciências da Terra 6 (2): 341 – 352
- 89 Peeters J, Charlier G, Halen O. 1984. Pathogenicity of attaching effacing enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic suckling and weanling rabbits for newborn rabbits. Infection and Immunity 46 (3): 690 -696
- 90 Peruski L, Kay B, El – Yaseed R, El – Etr S, Cravioto A, Wierzbza T, Rao M, El – Ghorab N, Shaheen H, Khalil S, Kamal K, Wasfy M, Svennerholm A, Clemens J, Savarino S. 1999. Phenotypic diversity of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains from a community - based study of pediatric diarrhea in periurban Egypt. Journal of clinical microbiology 37(9): 2974 – 2978
- 91 Pradel N, Etienne – Mesmin L, Thévenot J, Cordonier C, Blanquet – Diot S, Livrelli V. 2015. In vitro adhesion properties of Shiga toxin – producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and humans. Frontiers in Microbiology 156(6): 1 – 10
- 92 Puerta – García A, Mateos – Rodriguez F. 2010. Enterobacterias. Medicine 10 (51): 3426 – 3431.
- 93 Raetz C, Whitfield C. 2002. Lipopolysaccharide Endotoxins. Annu. Rev. Biochem. 71, 635 – 700
- 94 Ramírez A, Ellis R. 1988. Nuevos conceptos sobre la enterotoxemia y colibacilosis en alpacas. Rev. Camélidos Sudamericanos 6: 9 – 17

- 95 Ramos A, Calibio B, Baquerizo M. 2006. Can the *fliC* PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism technique replace classic serotyping methods for characterizing the H antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Journal Of Clinical Microbiology* 44(4): 1453 – 1458
- 96 Ratiner, Y. 1998. New flagellin-specifying genes in some *Escherichia coli* strains. *Journal of Bacteriology* 180 (4): 979 – 984
- 97 Ratiner Y, Salmenlinna S, Eklund M, Kerkimäki M, Siitonen A. 2002. Serology and genetics of the flagellar antigen of *Escherichia coli* O157:H7a,7c. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (3): 1033 – 1040
- 98 Reeves P. 1994. Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide. *New Comprehensive Biochemistry* 27: 281 – 317
- 99 Rigobelo E, Gamez H, Marin J, Macedo C, Ambrosin J, Ávila F. 2006. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* 58(3): 305 – 310
- 100 Rivero M, Padola N, Etcheverria A, Parma A. 2004. *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome uremico hemolítico en Argentina. *Medicina* 64(4): 352 – 356
- 101 Rodríguez – Ángeles G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México* 44: 464 – 475
- 102 Rosadio R, Maturrano L, Pérez D, Castillo H, Véliz A, Luna L, Yaya K, Londoño P. 2012a. Avances en el estudio de la patogénesis y prevención de la enterotoxemia de las alpacas. *Rev Inv Vet Perú* 23(3): 251 – 260
- 103 Rosadio R, Maturrano L, Pérez D, Luna L. 2012b. El complejo entérico neonatal en alpacas andinas. *Rev Inv Vet Perú* 23(3): 261 – 271
- 104 Rosenchine L, Sonnenberg M, Japer J, Finlay B. 1992. Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. *The EMBO Journal* 11 (10): 3551 – 3560
- 105 Salcedo C. 1988. Ensayo Experimental de una bacterina de *Escherichia coli* para prevenir la colibacilosis en crías de alpacas. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 40 p.
- 106 Salit I, Gotschlich E. 1977. Hemagglutination by purified type I *Escherichia coli* pili. *J Exp Med* 146(5): 1169 – 1181

- 107 Samuel G, Reeves P. 2003. Biosynthesis of O antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. *Carbohydrate Research* 338 (23): 2503 – 2519
- 108 Savarino S, Fasano A, Watson J, Martin B, Levine M, Guandalini S, Guerry P. 1993. Enteraggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 3093 – 3097
- 109 [SENASA] Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. 2011. Camélidos sudamericanos: historia, usos y sanidad animal. Buenos aires. 38 p
- 110 Sheutz F, Strockbine N. 2005. Genus I. *Escherichia* Castellani and Chalmers 1919, 941T^{AL}. *Bergey's Manual of systematic bacteriology* 2: 607 – 624
- 111 Schmidt, G. 1973. Genetical studies on the lipopolysaccharide structure of *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.* 77:151 – 160
- 112 Silvera E, Perales R, Rodríguez J, López T, Gavidia C, Agapito J, Palacios C. 2012. Presencia de *Escherichia coli* O157 en crías de alpacas (*Vicugna pacos*). *Rev Inv Vet Perú* 23(1): 98 – 104
- 113 Smith H, Scotland S, Stokes N, Rowe B. 1990. Examination of strains belonging to enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups for genes encoding- EPE adherence factor and Vero cytotoxins. *Med. Microbiol* 31: 235 – 240
- 114 Sonntag A, Prager R, Bielaszewska M, Zhang W, Fruth A, Tshäpe H, Karch H. 2004. Phenotypic and genotypic analyses of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 strains from patients in Germany. *Journal of Clinical Microbiology* 42(3): 954 – 962
- 115 Stoebner, J, Payne S. 1988. Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 56:2891-2895.
- 116 Stevenson G, Andrianopoulos K, Hobbs M, Reeves P. 1996. Organization of the *Escherichia coli* k-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid J. *Bacteriol.* 178: 4885–4893
- 117 Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 207–217
- 118 Tennant S, Tauschek M, Azzopardi K, Bigham A, Bennet – Wood V, Hartland E, Qi W, Whittam T, Robins – Brown R. 2009. Characterisation of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of clinical origin. *BMC Microbiology* 9 (117): 1 – 11

- 119 Thu B, Scheutz F, Cam P, Serichantalergs O, Thu T, Minh T, Dalsgaard A. 2008. Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains isolated from children in a hospital case – control study in Hanoi, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology* 46(3): 996 – 1004
- 120 Tiba M, Moura C, Falsarella M, Leite D. 2011. Identification of putative new *Escherichia coli* flagellar antigens from human origin using serology, PCR-RFLP and DNA sequencing methods. *Braz J, Infect* 15 (2): 144 – 150
- 121 Timm C, Irino K, Gomes T, Vieira M, Guth B, Vaz T, Moreira C, Aleixo J. 2007. Virulence markers and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. *Letters in Applied Microbiology* 44: 419 – 425
- 122 Tobías J, Kassem E, Rubinstein U, Bialik A, Vutukuru S, Navaro A, Rokney A, Valinsky L, Ephros M, Cohen D, Muhsen K. 2015. Involvement of main diarrheagenic *Escherichia coli*, with emphasis on enteroaggregative *E. coli*, in severe non-epidemic pediatric diarrhea in a high-income country. *BMC Infectious Diseases* 15: 79 – 85
- 123 Tóth I, Nougayrède J, Dobrindt U, Ledger T, Bouty M, Morabito S, Fujiwara T, Sugai M, Hacker J, Eric Oswald. 2009. Cytolethal distending toxin type I and type IV genes are framed with lambdoid prophage genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity* 77(1): 492 – 500
- 124 Torres A. 2010. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. 1^{era} ed. USA: Bentham Books, 275p
- 125 Trisler P, Gottesman S. 1984. *lon* transcriptional regulation of genes necessary for capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 160:184 – 191.
- 126 UNAM. 2012. Formato de Instrucciones de la técnica de serotipificación: *Escherichia coli*
- 127 Van den Broeck W, Cox E, Oudega B, Goddeeris B. 2000. The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. *Veterinary Microbiology* 71: 223 – 244
- 128 Vidal J, Canízales – Rodríguez A, Gutiérrez – Jiménez J, Navarro – García, F. 2007. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública de México* 49 (5):376 – 386

- 129 Villacorta C; López T; Gonzáles A, Gómez L. 2009. Evaluación de *Cryptosporidium parvum* como factor de riesgo para la presentación de diarrea neonatal en alpacas en Cusco. Rev Inv Vet Perú 20 (2): 277 – 284
- 130 Waalwijk C, MacLaren D, DeGraaff J. 1983. In vivo function of hemolysin in the nephropathogenicity of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 42: 245 – 249
- 131 Wieler L, Busse B, Steinrück H, Beutin L, Weber A, Karch H, Balger G. 2000. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) strains of serogroup O157 display three distinctive clonal groups of EHEC pathogens. Journal of clinical microbiology 38(6): 2162 – 2169
- 132 Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler L, Karch H, Reeves P, Maiden M, Ochman H, Achtman M. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. Molecular Microbiology 60(5): 1136 – 1151
- 133 Zhang W, Bielaszewska M, Bockemühl J, Schmidt H, Scheut F, Karch H. 2000. Molecular analysis of H antigens reveals that human diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains that carry the *eae* gene belong to the H11 clonal complex. Journal Of Clinical Microbiology 38 (8): 2989 – 2993.